

Regulation des Aktivierungs-Induzierten Zelltods in peripheren humanen T-Zellen durch das antiapoptotische Protein c-FLIP

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biochemiker Cornelius Fritsch
geboren am 28. April 1976 in Leonberg

im Oktober 2005

ehrenwörtliche Versicherung zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

Anlässlich der von mir beantragten Eröffnung des Promotionsverfahrens versichere ich hiermit ehrenwörtlich:

- Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.
- Die von mir eingereichte Dissertation wurde von mir selbst angefertigt. Alle verwendeten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen sind angegeben.
- Auswahl und Auswertung des Materials sowie Erstellung des Manuskripts erfolgten selbständig.
- Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Dritte erhielten von mir weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten, die im Zusammenhang mit der von mir vorgelegten Dissertation stehen.
- Die vorliegende Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.
- Von mir wurde keine weitere schriftliche Arbeit als Dissertation an einer anderen Hochschule eingereicht.

Gutachter:

Prof. Dr. Claus Liebmann, Jena

Prof. Dr. Peter H. Krammer, Heidelberg

Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin, Ulm

öffentliche Verteidigung: 30. Januar 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Immungenetik des Deutschen Krebsforschungszentrums unter Leitung von Prof. Dr. Peter H. Krammer angefertigt. An der Friedrich-Schiller-Universität wurde diese Arbeit durch Prof. Dr. Claus Liebmann vertreten.

Ich möchte mich bedanken.

Zunächst gilt mein Dank Prof. Dr. Peter H. Krammer, in dessen Abteilung ich diese Arbeit anfertigen durfte. Neben vielen Einblicken in die Biologie von T-Zellen verdanke ich meiner Zeit in dieser Abteilung einen in vielen Seminaren geschärften Blick für „das Wesentliche“ bei der experimentellen Planung wie auch der kritischen Rezeption wissenschaftlicher Veröffentlichungen. Ebenfalls danken möchte ich Prof. Dr. Claus Liebmann, dessen Bereitschaft zur Betreuung ich es verdanke, die Promotion an der Friedrich-Schiller-Universität Jena anstreben zu können.

Ohne meine Kollegen in der Abteilung Immungenetik wäre diese Arbeit zum Scheitern verurteilt gewesen. Die stetige Bereitschaft, bei Problemen und Fragen mit der eigenen Meinung, Tipps und Ratschlägen zur Verfügung zu stehen, ist keine Selbstverständlichkeit, aber für kreative Prozesse unabdingbar. Einzelne durch Namensnennung hervorzuheben, scheint da nicht fair zu sein, ich will es trotzdem versuchen: danke, Min, Inna, Karsten, Rüdiger, Dirk, Alex, Dagmar, Sven, Steffi, Nadine, Heiko, Christian, Lucie, Marcin.

Dankbar bin ich allen Azubis, die es mit mir und meinen Ausbildungsversuchen ausgehalten haben. Ihr habt mir sehr geholfen: André, Melanie, Meike, Jochen, Diana.

Dank gebührt selbstverständlich all jenen, die ihr Blut für Experimente zur Verfügung gestellt haben. Und denen, die immer bereit waren, „ein halbes Stündchen“ für die Blutentnahmen zu opfern: danke, Henning, Frank, Anne, Detlev, Benedikt.

Wissenschaft ist nicht alles. Und nicht alles ist Wissenschaft. Für tägliche Hilfestellungen beim immer wieder erneuten Ausloten dieser Erkenntnisse, für viel Spaß und Unterstützung, aber auch viel Geduld und Liebe möchte ich Anja danken.

Meine Eltern schließlich sind es, die es mir ermöglicht haben, diesen Weg einzuschlagen. Ohne ihre Unterstützung und Rückendeckung wäre ich jetzt nicht hier. Danke!

Ich widme diese Arbeit dem Andenken an meinen Bruder Alexander.

ZUSAMMENFASSUNG	6
EINLEITUNG	7
1. Apoptose – der programmierte Zelltod	7
1.i. Apoptose und Homöostase	7
1.ii. Induktion von Apoptose	8
1.ii.1. Caspasen – Initiatoren und Effektoren apoptotischer Prozesse	9
1.ii.2. Der intrinsische Signalweg	9
1.ii.3. Rezeptorvermittelte Apoptose – der extrinsische Signalweg	11
1.ii.4. c-FLIP – ein wichtiger Regulator rezeptorabhängiger Apoptose	15
2. T-Lymphocyten im menschlichen Immunsystem	18
2.i. Das Immunsystem	18
2.ii. Die adaptive Immunantwort	18
2.ii.1. Antigenpräsentation und -rezeptoren	18
2.ii.2. B- und T-Lymphocyten	19
2.ii.3. Antigenerkennung und Aktivierung von T-Lymphocyten	20
2.ii.4. T-Lymphocyten – Zelltypen und Funktionen	21
2.iii. Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors	23
2.iii.1. Der T-Zell-Rezeptor ist ein multimerer Komplex aus Membranproteinen	23
2.iii.2. Adapterproteine und Proteinkinasen sind für die Übertragung des TCR-Signals essentiell	24
2.iii.3. Intrazelluläre TCR-abhängige Signaltransduktionsvorgänge	25
2.iii.4. Möglichkeiten der <i>in vitro</i> -Stimulation von T-Lymphocyten	27
2.iv. Aktivierungs-Induzierter Zelltod von T-Lymphocyten	28
2.iv.1. Die Apoptosesensitivität von T-Lymphocyten ist streng reguliert	28
2.iv.2. c-FLIP als Regulator der Apoptosesensitivität primärer T-Lymphocyten	30
3. Fragestellung	31
MATERIAL UND METHODEN	33
1. Material	33
1.i. Zelllinien	33
1.ii. Inhibitoren und Pharmaka	33
1.iii. Antikörper, Plasmide und Oligonukleotide	34
1.iv. Häufig verwendete Puffer und Lösungen	36
2. Methoden	37
2.i. Zellkultur	37
2.ii. Isolation und Kultivierung primärer humaner T-Lymphocyten	38

2.iii. TCR-Stimulation von T-Lymphocyten	38
2.iv. Analyse von apoptotischem Zelltod mittels Durchflusscytometrie	39
2.v. Transfektion	39
2.vi. Luciferase-Reporterexpressionsexperiment	39
2.vii. Western Blot	40
2.viii. RNA-Isolation und RT-PCR	41
2.ix. Molekularbiologie	42
2.ix.1. Transformation und Kryokonservierung von Bakterien	42
2.ix.2. Plasmid-Isolation	43
2.ix.3. Isolation genomischer DNA	43
2.ix.4. Klonierung von Reporter-Konstrukten	44
2.ix.5. Generierung von Deletionsmutanten mit Exonuclease SI	46
ERGEBNISSE	47
1. Analyse der Expression von c-FLIP in primären T-Lymphocyten	47
1.i. Expression von c-FLIP wird durch TCR-Stimulation induziert	48
1.i.1. Stimulation des T-Zell-Rezeptors führt zu Induktion mehrerer c-FLIP-Splicevarianten	48
1.i.2. Inhibition verschiedener Signaltransduktionswege verhindert die Induktion von c-FLIP	49
1.ii. Die Induktion von c-FLIP ist transkriptionell reguliert	52
1.iii. TCR-Stimulation induziert die Expression von c-FLIP mRNAs mit unterschiedlichen 5'-untranslatierten Regionen	54
1.iv. Zusammenfassung	57
2. Analyse der Expression von c-FLIP in Jurkat T-Lymphocyten	58
2.i. Expression von c-FLIP in Jurkat wird induziert durch Stimulation mit PMA und Ionomycin	58
2.ii. Die Induktion von c-FLIP ist transkriptionell reguliert	60
2.iii. Stimulation von Jurkat T-Lymphocyten induziert Expression von c-FLIP mRNAs mit unterschiedlichen 5'-untranslatierten Regionen	61
2.iv. Zusammenfassung	62
3. Identifikation und Analyse des Promoters von c-FLIP	63
3.i. Die 5'-Region des <i>cflar</i> -Gens enthält zwei potenzielle Promotoren	63
3.ii. pFLIP(1) ist konstitutiv aktiv und reagiert nicht auf Stimulation	64
3.iii. Reporterexpression von pFLIP(2) ist durch Stimulation induzierbar	66
3.iv. Die Induktion von pFLIP(2) reagiert auf Signaltransduktionsinhibitoren	67
3.v. Serielle Deletionen erlauben die Identifikation einer Minimalregion in pFLIP(2)	69
3.vi. Bindedomänen für die Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF-κB sind essentiell für die Induktion von pFLIP(2)	71
4. Zusammenfassung	74

DISKUSSION	75
1. Zusammenfassung der Ergebnisse	75
1.i. c-FLIP-Expression in primären humanen T-Lymphocyten	75
1.ii. c-FLIP-Expression in Jurkat T-Lymphocyten	76
1.iii. Zwei Promotoren steuern die Expression von c-FLIP in T-Lymphocyten	77
2. c-FLIP in T-Lymphocyten	79
3. Weiterführende Experimente und Ausblick	80
3.i. Weitere Charakterisierung von pFLIP(2)	80
3.ii. Expression von c-FLIP in anderen hämatopoetischen Zellen	81
3.iii. Analyse der Rolle von c-FLIP mit Hilfe transgener Tiermodelle	81
3.iv. c-FLIP in Autoimmunerkrankungen	82
3.v. c-FLIP als Tumorprogressionsfaktor	82
3.vi. Manipulation der c-FLIP-Expression	83
LITERATURVERZEICHNIS	84

Zusammenfassung

Die Apoptosesensitivität von T-Lymphocyten ist stringent reguliert. Während naive und frisch aktivierte T-Lymphocyten weitestgehend resistent gegen Ligation des Todesrezeptors CD95 sind, ist in der Deletionsphase der Immunantwort diese Resistenz aufgehoben. Stimulation des Antigenrezeptors führt zu CD95-abhängiger Apoptose in einem Teil der Zellen.

Gleichzeitig induziert Stimulation des T-Zell-Rezeptors in T-Lymphocyten die Neoexpression des antiapoptotischen Caspase-8-Homologen c-FLIP. Dieses Protein wird an den CD95-Signalkomplex rekrutiert und inhibiert dort die proteolytische Prozessierung und Aktivierung der Initiatorcaspasen Caspase-8 und Caspase-10.

Ziel dieser Arbeit war es, eine detaillierte Analyse der TCR-abhängigen Expression von c-FLIP in T-Lymphocyten vorzunehmen. Dazu wurden neben der T-Zelllinie Jurkat hauptsächlich primäre humane T-Lymphocyten aus peripherem Blut eingesetzt.

Mit Hilfe spezifischer Signaltransduktionsinhibitoren wurde etabliert, dass die Induktion von c-FLIP in TCR-stimulierten T-Lymphocyten von den wichtigen TCR-Signalmodulen MEK/ERK, PI3K/Akt und Ca^{2+} /Calcineurin abhängt.

Durch Inhibition von Caspasenaktivität wurde nachgewiesen, dass alle endogen exprimierten Proteinvarianten von c-FLIP von dieser TCR-abhängigen Induktion betroffen sind.

Analyse der c-FLIP-Transkripte in ruhenden und TCR-stimulierten T-Lymphocyten ergab überraschender Weise, dass in ruhenden Zellen hauptsächlich c-FLIP-mRNAs exprimiert sind, deren 5'-UTR aus dem 1. Exon des *cflar*-Gens besteht, während die Stimulation des T-Zell-Rezeptors zu selektiver Induktion von c-FLIP-mRNAs führt, in die Exon 2 als 5'-UTR inkorporiert wurde.

Durch Datenbanksuche wurden zwei potenzielle Promoterregionen am 5'-Ende des ersten (pFLIP(1)) und zweiten Exons (pFLIP(2)) des *cflar*-Gens identifiziert. Reporterexpressions-experimente erlauben die Aussage, dass pFLIP(1) konstitutiv exprimiert wird, während pFLIP(2) keine Basalaktivität aufweist, jedoch durch TCR-Stimulation stark induziert werden kann. Das Inhibitionsprofil von pFLIP(2) durch Signaltransduktionsinhibitoren korreliert gut mit der Regulation der endogenen Proteinexpression; die Aktivität von pFLIP(2) hängt von NF- AT - und NF- κB -Bindestellen im Promoter ab.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben die Aussage, dass ein aktivierungs-spezifischer Promoter für die Höherexpression von c-FLIP nach Stimulation des Antigenrezeptors von T-Lymphocyten verantwortlich ist.

Einleitung

1. Apoptose – der programmierte Zelltod

1.i. Apoptose und Homöostase

Unter Apoptose oder programmiertem Zelltod versteht man ein stringent reguliertes genetisches Programm, das genutzt wird, um Körperzellen aus dem Gewebeverbund zu entfernen (Kerr *et al.*, 1972). Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung von komplexen Organsystemen wie Gehirn oder Extremitäten (Glucksmann, 1951). Im adulten Organismus ist Apoptose beteiligt an so diversen Vorgängen wie der Gewebeerneuerung in Epithelien und Leber, der Eliminierung potenziell autoreaktiver Lymphocyten, oder der Beendigung einer Immunantwort durch Beseitigung aktivierter T- und B-Lymphocyten (Los *et al.*, 1999; Thompson, 1995; Vaux und Korsmeyer, 1999).

Die Bedeutung der Elimination von Körperzellen durch Zelltod wurde initial in Untersuchungen zur Embryogenese festgestellt (Barclay *et al.*, 1944; Clarke und Clarke, 1996). Später wurde erkannt, dass das Absterben toxinbehandelter Zellen morphologisch mit diesem embryonalen Zelltod vergleichbar ist. Die Aufklärung der Rolle von apoptotischem Zelltod in der Homöostase von Immunsystem und anderen Organsystemen (Krammer, 2000) sowie bei der Eliminierung virusinfizierter Zellen (Thompson, 1995) trug weiter dazu bei, das Interesse an diesem genetischen Programm und seinen molekularen Grundlagen auf sein derzeitiges Niveau zu steigern. Die biochemische und morphologische Charakterisierung der Vorgänge in apoptotisch sterbenden Zellen zeigte einige auffallende Veränderungen, die als charakteristisch für den apoptotischen Prozess angesehen werden (**Abb. 1**). So beobachtet man eine Kondensation des Chromatins in den Kernen sterbender Zellen. Parallel dazu wird die DNA durch spezifische Endonukleasen internukleosomal gespalten, was zur Entstehung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 200 bp oder einem Vielfachen davon führt (Wyllie, 1980). Des Weiteren geht die Asymmetrie der Zellmembran verloren, und das negativ geladene Phospholipid Phosphatidylserin wird auf der Außenseite der Zelle präsentiert (Fadok *et al.*, 1992), bevor die Zelle beginnt, cytoplasmahaltige Vesikel abzuschnüren (Zeiose). Die Externalisierung von Phosphatidylserin ist vermutlich eines der Merkmale, die zur Erkennung apoptotischer Zellen und ihrer Vesikel führen und ihre Phagocytose durch professionell phagocytierende Zellen, aber auch benachbarte Epithelzellen vermitteln (Savill *et al.*, 1993).

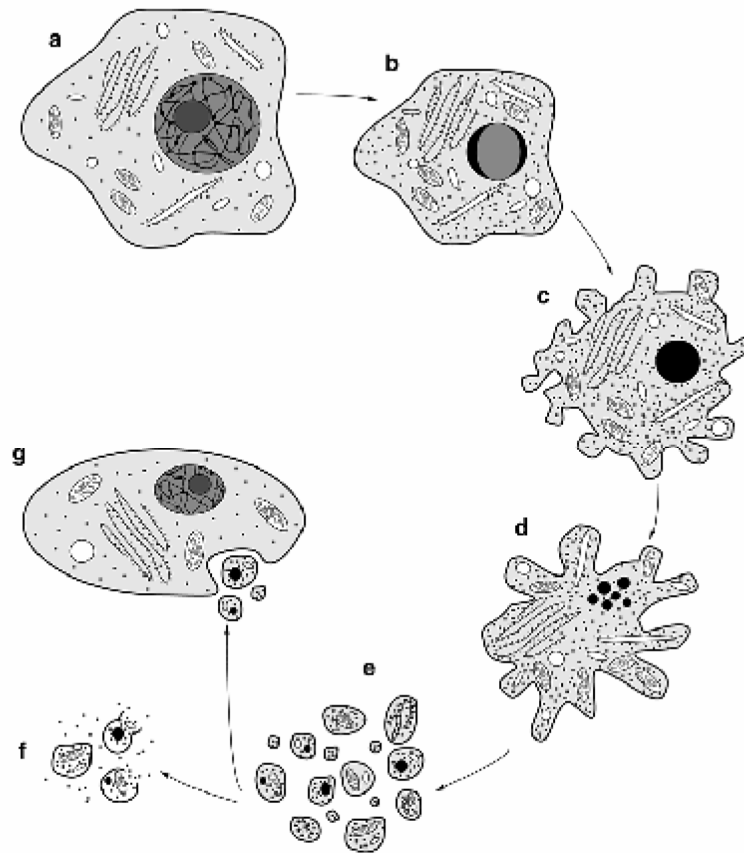


Abbildung 1. Morphologische Kennzeichen der Apoptose

Im Verlauf der Apoptose beobachtet man eine Verringerung des Zellvolumens und Kondensation des Chromatins (b), gefolgt von Membranausstülpungen (c, d) und Zerfall der Zelle in apoptotische Vesikel (e), die entweder zerfallen (f) oder von benachbarten Zellen phagocytiert werden (g).

1.ii. Induktion von Apoptose

Apoptose kann in einer Zelle auf zwei grundlegend unterschiedliche Arten eingeleitet werden. Neben der zellautonomen Einleitung von apoptotischem Zelltod durch mitochondriale Permeabilisierung besteht die Möglichkeit, in einer Zelle durch Stimulation spezieller Rezeptoren, der so genannten Todesrezeptoren, gezielt von außen die apoptotische Maschinerie in Gang zu setzen. Erstere Möglichkeit, auch als „intrinsische Apoptose“ bezeichnet, wird häufig im Zusammenhang mit genotoxischen Schädigungen durch Cytostatika oder mutagene Strahlung induziert (Ferri und Kroemer, 2001; Takahashi *et al.*, 2004), während die rezeptorvermittelte Induktion von Apoptose eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung des

Immunsystems und in der Immunhomöostase spielt, aber auch eine Grundlage für die Effektorfunktion cytotoxischer Lymphocyten darstellt (Krammer, 2000; Krammer *et al.*, 1994).

1.ii.1. CASPASEN – INITIATOREN UND EFFEKTOREN APOPTOTISCHER PROZESSE

Ein wichtiges biochemisches Merkmal des apoptotischen Zelltods ist die Aktivierung von Caspasen, spezialisierten Cystein-Proteasen, deren Substratspezifität das Vorhandensein eines Aspartatrestes an der Schnittstelle erfordert (Cohen, 1997; Stennicke und Salvesen, 1998; Thornberry und Lazebnik, 1998). Caspasen können in drei Gruppen unterteilt werden: während die Caspasen 1, 5, 11, 12, 14 keine Funktion für die Transduktion proapoptotischer Signale ausüben, kann man die apoptotisch relevanten Caspasen in die Gruppe der Initiatorcaspasen (Caspase 8, 9, 10) und die Gruppe der Effektorcaspasen (vor allem Caspase 3, 6 und 7) unterteilen. Caspasen werden als inaktive Proenzyme synthetisiert, die durch proteolytische Abspaltung einer Prodomäne aktiviert werden müssen.

Initiatorcaspasen werden direkt in Reaktion auf einen proapoptotischen Stimulus aktiviert – ein Mechanismus, der in der Regel von autoproteolytischer Aktivität abhängt – und aktivieren ihrerseits durch Proteolyse die Effektorcaspasen. Nach ihrer Aktivierung spalten diese ihrerseits weitere Substrate. Die Spaltung der Substrate von Effektorcaspasen kann mit vielen morphologischen Phänomenen des apoptotischen Zelltods in Verbindung gebracht werden. So wird beispielsweise durch Proteolyse das Protein ICAD (Inhibitor of CAD) inaktiviert, wodurch die Endonuclease CAD (caspase-activated DNase) in den Zellkern gelangen kann; die internucleosomale Spaltung genomischer DNA in apoptotisch sterbenden Zellen ist von CAD abhängig (Nagata, 2000).

Der Unterschied zwischen intrinsischer und extrinsischer Apoptose liegt hauptsächlich in den Mechanismen, die zur Aktivierung der jeweiligen Initiatorcaspasen benötigt werden, und soll im Folgenden skizziert werden.

1.ii.2. DER INTRINSISCHE SIGNALWEG

Die intrinsische Apoptose wird durch einen Prozess eingeleitet, den man als „Aktivierung“ der Mitochondrien oder mitochondriale Permeabilitätstransition (MPT) bezeichnet (Chao und Korsmeyer, 1998; Norbury und Zhivotovsky, 2004). Eine wichtige Rolle hierbei spielt die Proteinfamilie der Bcl-2-homologen Proteine (Chao und Korsmeyer, 1998).

Bcl-2 wurde ursprünglich als Oncogen mit einer wichtigen Funktion bei der Entstehung von B-Zell-Lymphomen identifiziert (McDonnell *et al.*, 1989). Anhand ausgedehnter Homologie wurden

schnell weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie identifiziert, die sich alle durch die Anwesenheit einer oder mehrerer Bcl-2-Homologiedomänen (BH1 – BH4) auszeichnen (Chao und Korsmeyer, 1998). Diese Domänen erlauben eine Unterteilung der Bcl-2-Proteinfamilie in zwei Gruppen (**Abb. 2**):

Die antiapoptotisch wirksamen Proteine Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, Bfl/A1 und Bcl-W weisen alle 4 Bcl-2-Homologiedomänen auf. Man vermutet, dass ihre Funktion hauptsächlich in der Stabilisierung der mitochondrialen Membran liegt, in die sie mittels einer Transmembrandomäne inserieren können. Im Nematoden *Caenorhabditis elegans*, einem Modellorganismus, in dem viele Mechanismen der Apoptose aufgeklärt wurden, kann das antiapoptotische Bcl-2-homologe Protein CED-9 die Aktivierung der Caspase CED-3 durch Sequestrierung des Adapterproteins CED-4 verhindern (Spector *et al.*, 1997), was eine alternative Hypothese für die Funktionsweise antiapoptotischer Bcl-2-Proteine in Säugerzellen zulässt. Dieser Mechanismus scheint jedoch in Säugerzellen nicht genutzt zu werden (Moriishi *et al.*, 1999; Newmeyer *et al.*, 2000).

Die proapoptotisch wirksamen Bcl-2-artigen Proteine lassen sich wiederum in zwei Subklassen unterteilen: die „Multidomänen“-Homologe von Bcl-2, Bax, Bak und Bok, weisen BH1-, BH2- und BH3-Domänen sowie eine Transmembranregion auf, während die „BH3-only“-Homologe von Bcl-2, vor allem Bad, Bik, Bid, Puma, Noxa und Bim, nur eine BH3-Domäne besitzen. Alle proapoptotischen Bcl-2-Proteine können über ihre BH3-Domäne mit antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen interagieren; diese Interaktion scheint für die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und die Einleitung von Apoptose unabdingbar zu sein (Zha *et al.*, 1997).

Transkriptionelle Induktion von BH3-only-Proteinen wie beispielsweise Puma und Noxa nach Aktivierung von p53 (Nakano und Vousden, 2001; Oda *et al.*, 2000) oder Modulation ihrer Bindungseigenschaften durch posttranslationale Modifikation (z. B. Phosphorylierung von Bad durch Proteinkinase A, Raf-1 oder Proteinkinase B / Akt (Datta *et al.*, 1997; Scheid und Duronio, 1998; Scheid *et al.*, 1999; Zha *et al.*, 1996)) verschiebt das zelluläre Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen. Die Rekrutierung proapoptotischer Bcl-2-Proteine an die Mitochondrien leitet ein Phänomen ein, das als mitochondriale Permeabilisierung beschrieben wird und bisher nur unvollständig aufgeklärt wurde. Entweder durch Interaktion der Bcl-2-Proteine mit existierenden Proteinkanälen in der Mitochondrienmembran oder durch Oligomerisierung proapoptotischer Bcl-2-Proteine bilden sich Poren in der mitochondrialen Membran, durch die Adapter- und Effektormoleküle in das Cytoplasma freigesetzt werden (Bernardi *et al.*, 1994; Ferri und Kroemer, 2001; Kroemer und Reed, 2000; Vieira *et al.*, 2000; Zamzami *et al.*, 2000). Parallel beobachtet man eine Verringerung des mitochondrialen Transmembranpotentials (Petit *et al.*, 1995; Zamzami *et al.*, 1995). Diese scheint allerdings nicht

kausal mit der Freisetzung apoptotischer Effektoren verknüpft zu sein (Loeffler und Kroemer, 2000). Ein wichtiger proapoptotischer Effektor, der aus Mitochondrien freigesetzt wird, ist Cytochrom c.

Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien führt zur ATP-abhängigen Ausbildung eines Multiproteinkomplexes aus dem Adaptermolekül Apaf-1, Cytochrom c und der Initiatorcaspase Caspase-9. Die Ausbildung dieses so genannten „Apoptosoms“ führt zur Aktivierung von Caspase-9, die dadurch in die Lage versetzt wird, Effektorcaspasen wie Caspase-3 und Caspase-7 durch Proteolyse zu aktivieren (Acehan *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 1999).

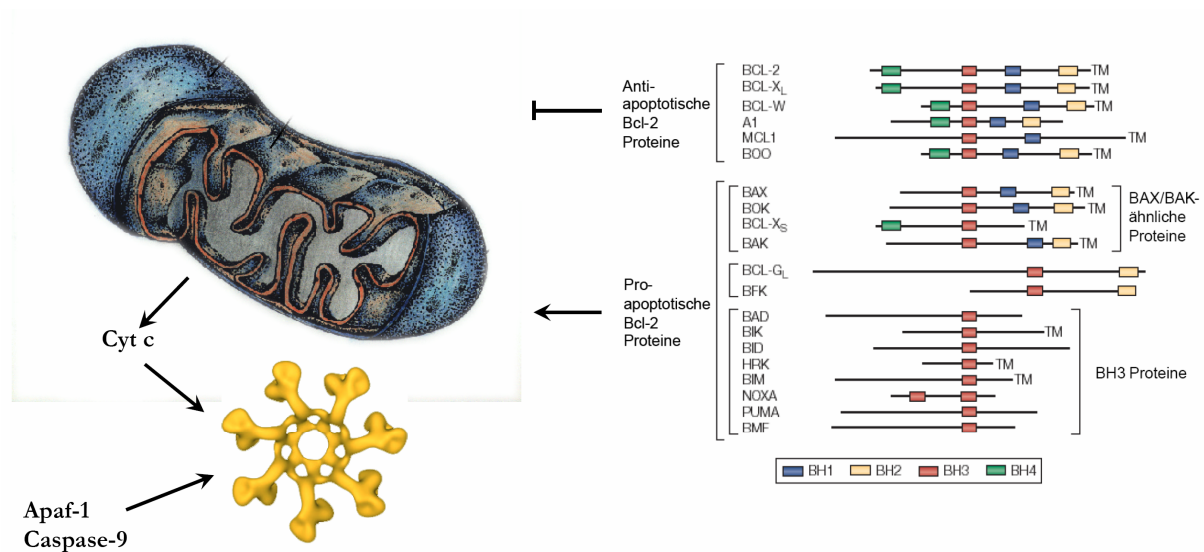


Abbildung 2. Mitochondriale Aktivierung führt zur Ausbildung des Apoptosoms

Die pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie (rechts) stehen in Wechselwirkung miteinander und mit der äußeren Mitochondrienmembran. Bei Vorliegen eines proapoptotischen Stimulus führt die Sequestrierung antiapoptotischer und/oder die Aktivierung proapoptotischer Moleküle zur Permeabilisierung der inneren Mitochondrienmembran. Zu den freigesetzten Effektoren gehört Cytochrom c, das mit dem Adapterprotein Apaf-1 und der Initiatorcaspase Caspase-9 das Apoptosom ausbildet, einen makromolekularen Komplex, in dem Caspase-9 aktiviert wird. Nach (Acehan *et al.*, 2002; Strasser *et al.*, 2000a).

1.ii.3. REZEPTORVERMITTELTE APOPTOSE – DER EXTRINSISCHE SIGNALWEG

Während der intrinsische Signalweg weitgehende Parallelen zwischen dem Nematoden *C. elegans* und höher entwickelten Säugetieren aufzeigt, existiert in Säugerzellen ein weiterer Mechanismus zur Induktion von Apoptose. Dieser extrinsische Signalweg weist keine Homologie zu bisher bekannten Mechanismen in *C. elegans* auf.

Grundlage für die Existenz des extrinsischen Signalwegs ist das Vorhandensein spezialisierter Oberflächenrezeptoren auf Säugerzellen, die als Oligomerisierungsplattform für Initiatorcaspasen dienen können. Diese so genannten Todesrezeptoren sind Mitglieder der Genfamilie der TNF-/NGF- (Tumornekrosefaktor-/Nervenwachstumsfaktor-) Rezeptoren (Bodmer *et al.*, 2002;

Locksley *et al.*, 2001). Ihr gemeinsames Merkmal innerhalb dieser Proteinfamilie ist das Vorhandensein einer spezialisierten Proteininteraktionsdomäne in ihren intrazellulären Regionen, der Todesdomäne (death domain, DD) (Aravind *et al.*, 1999; Weber und Vincenz, 2001), während ihre extrazellulären Bereiche die für diese Rezeptorfamilie typischen cysteinreichen Domänen aufweisen (Locksley *et al.*, 2001). Bisher sind acht Todesrezeptoren bekannt (**Abb. 3**).

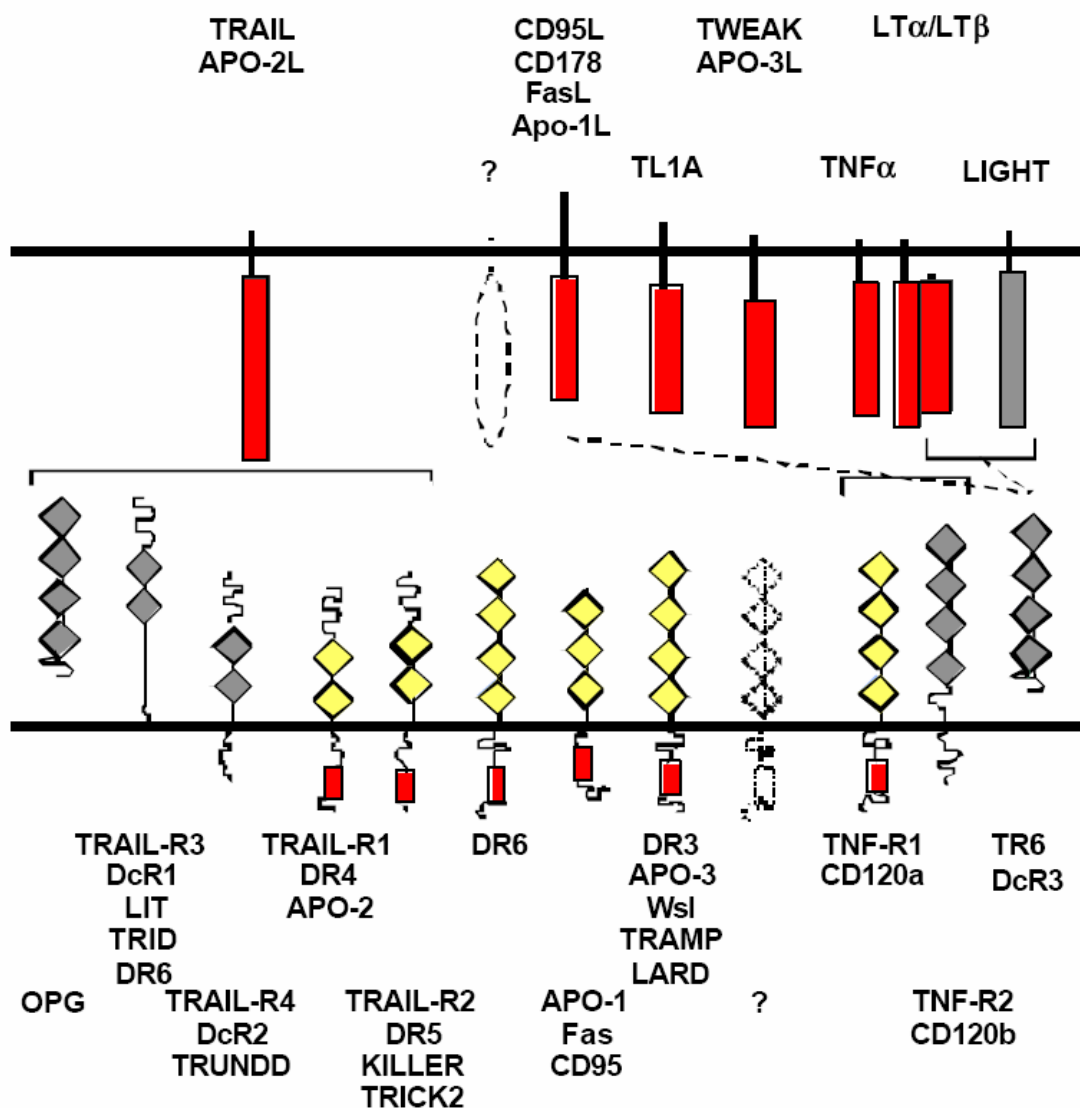


Abbildung 3. Todesrezeptoren und ihre Liganden

Die für TNF-Rezeptoren typische cysteinreiche Domäne wird durch eine Raute dargestellt. Interaktionen zwischen Liganden und Rezeptoren sind angedeutet. Rezeptoren, die keine Todesdomäne (rot) aufweisen, können keine Apoptose auslösen. Diese sind grau dargestellt.

Neben dem prototypischen Todesrezeptor CD95 (Itoh *et al.*, 1991; Oehm *et al.*, 1992; Trauth *et al.*, 1989; Yonehara *et al.*, 1989) handelt es sich hierbei um TNF-R1 (TNF- α -Rezeptor 1, CD120a), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis-inducing

ligand (TRAIL) receptor 1, APO-2, DR4), TRAIL-R2 (TRAIL receptor 2, DR5, KILLER, TRICK), DR6 (death receptor 6), NGFR (Nerve Growth Factor (NGF) receptor) und EDAR (Ectodysplasin A receptor).

Die Liganden der Todesrezeptoren sind Mitglieder der TNF- / NGF-Genfamilie. Typischerweise treten sie nach Stimulation als membranständige Homotrimere auf, wobei lösliche Formen einiger Liganden bereits beschrieben sind (Gruss und Dower, 1995). Die Bindung eines trimerisierten Liganden an seinen Rezeptor (**Abb. 3**) führt zur Assemblierung eines intrazellulären Signalkomplexes.

CD95 ist der erste Todesrezeptor, der in murinen und humanen Zellen beschrieben wurde. Die Signale, die nach Ligation dieses Rezeptors zur Induktion von Apoptose in der rezeptor-exprimierenden Zelle führen, wurden ausführlich charakterisiert und können als prototypisch für die meisten anderen Todesrezeptoren angesehen werden.

CD95, ein glykosyliertes Typ I-Transmembranprotein, liegt an der Zelloberfläche vermutlich hauptsächlich in monomerer Form vor, wobei die Existenz vorgebildeter, inaktiver Homotrimere wahrscheinlich ist (Chan *et al.*, 2000; Papoff *et al.*, 1999; Siegel *et al.*, 2000). Nach Bindung des Liganden CD95L (CD178, APO-1 ligand, FasL) wird durch Konformationsänderungen die Bildung eines Multiproteinkomplexes initiiert, der auf Protein-Protein-Interaktionen unter Einbeziehung der Todesdomäne und eines verwandten Interaktionsmotivs, der Todeseffektordomäne (death effector domain, DED) basiert. In diesem Multiproteinkomplex werden die Initiatorcaspasen Caspase-8 und Caspase-10 durch Autoproteolyse aktiviert. Die Bezeichnung DISC (death-inducing signaling complex) für diesen Komplex wurde 1995 etabliert (Kischkel *et al.*, 1995).

Innerhalb weniger Sekunden nach Stimulation werden einige wichtige Adapter- und Effektormoleküle an die intrazelluläre Todesdomäne von CD95 rekrutiert (**Abb. 4**): das Adapterprotein FADD / MORT1 bindet über eine DD an CD95 und stellt eine DED für weitere Interaktionen zur Verfügung (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995). Über homologe DED-DED-Interaktionen werden weitere Proteine an den Signalkomplex rekrutiert: die DED-enhaltenden Initiatorcaspasen Caspase-8 und Caspase-10 sowie das zu diesen homologe Protein c-FLIP (cellular FLICE¹-inhibitory protein) (Kischkel *et al.*, 2001; Muzio *et al.*, 1996; Sprick *et al.*, 2002). In diesem Komplex werden Caspase-8 und Caspase-10 autoproteolytisch aktiviert. Bei der Transmission des apoptotischen Stimulus auf die Ebene der

¹ FLICE war der ursprüngliche Name von Caspase-8. Der Name leitet sich ab von FADD (Fas-associated death domain containing protein)-like ICE (interleukin-1 β converting enzyme, der ursprüngliche Name von Caspase-1).

Effektorcaspasen kann man zwei unterschiedliche Zelltypen unterscheiden (**Abb. 4**) (Scaffidi *et al.*, 1998).

Bei den Zelltypen, die als CD95 Typ I bezeichnet werden, bilden sich große Mengen an aktivem DISC aus, die zu einer schnellen, starken Aktivierung von Caspase-8 führen. Diese großen Mengen an aktiver Caspase-8 sind ausreichend, um direkt zu proteolytischer Aktivierung von Effektorcaspasen zu führen (Scaffidi *et al.*, 1998).

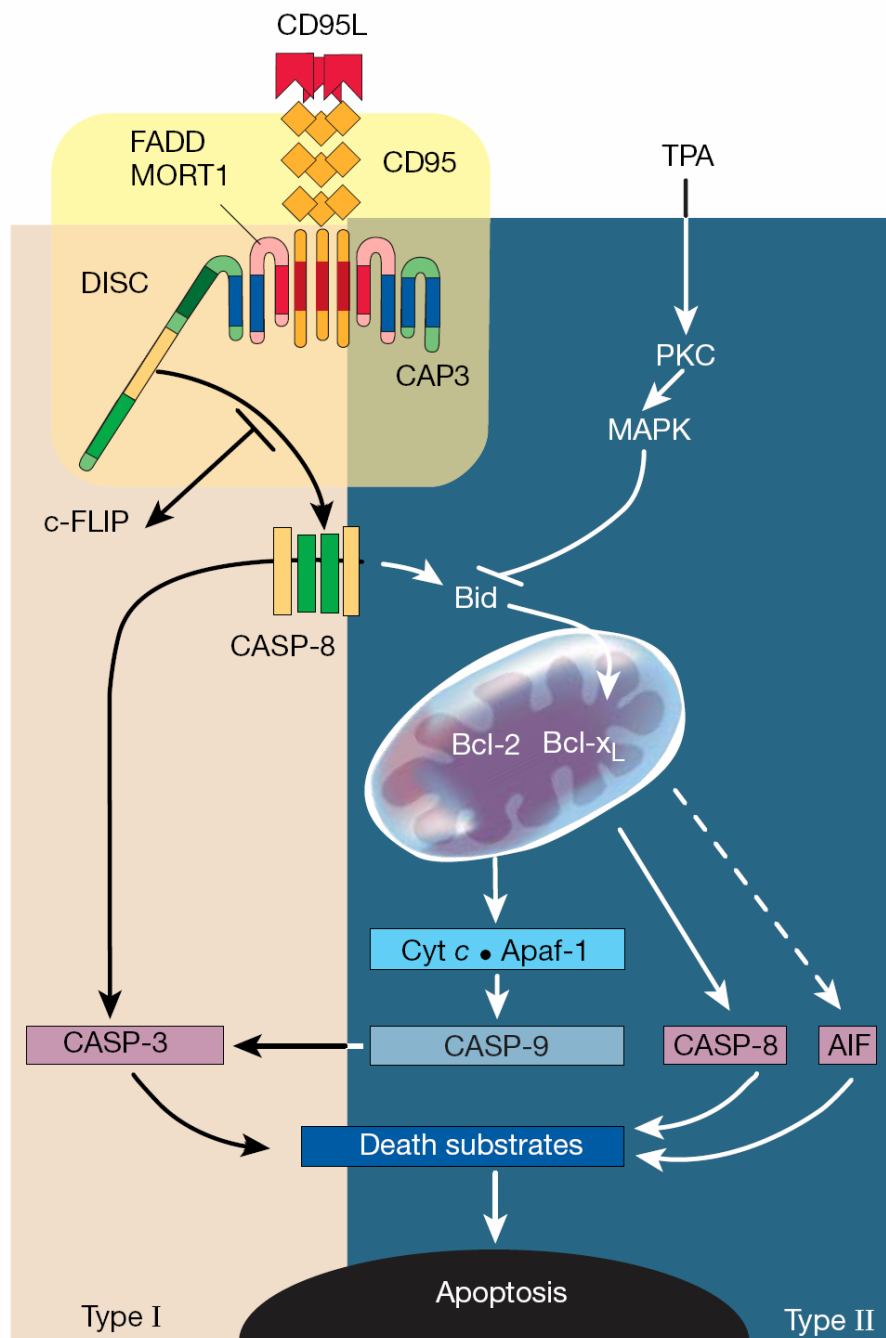


Abbildung 4. Zwei Signalwege der CD95-vermittelten Apoptose
Nach (Krammer, 2000)

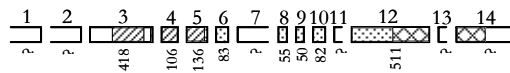
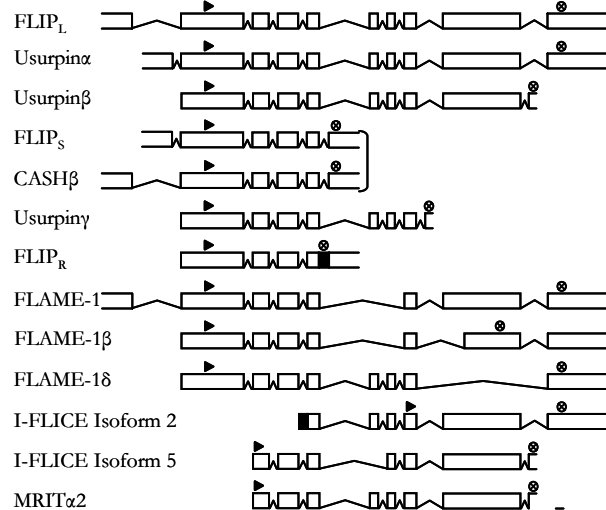
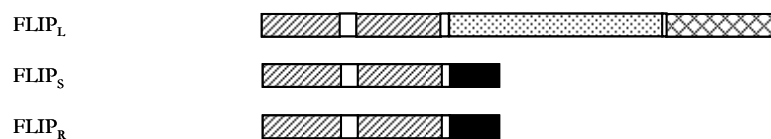
Im Gegensatz hierzu kann in CD95 Typ II-Zellen eine verringerte Ausbildung des DISC beobachtet werden. Die geringe Menge an aktiver Caspase-8, die in diesen Zellen gebildet wird, reicht nicht für eine direkte Aktivierung der Effektorcaspasen aus. Allerdings kann man mitochondriale Permeabilisierung nach Spaltung des proapoptotischen Bcl-2-Proteins Bid beobachten (Scaffidi *et al.*, 1998). Als direkte Folge werden Caspase-9 und Caspase-3 aktiviert. Die Relevanz dieser mitochondrialen Verstärkung kann man daran erkennen, dass in Typ II-Zellen die CD95-abhängige Induktion von Apoptose durch Überexpression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine verhindert werden kann, während Typ I-Zellen auf diese Art nicht desensitiviert werden können (Scaffidi *et al.*, 1998). Diese Beobachtung wurde auch in transgenen Tiermodellen gemacht: Hepatocyten, die allgemein als CD95 Typ II-Zellen betrachtet werden, sind in Bcl-2 überexprimierenden Mäusen resistent gegenüber CD95-abhängiger Apoptose (Lacronique *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1996; Strasser, 1995).

1.ii.4. c-FLIP – EIN WICHTIGER REGULATOR REZEPTORABHÄNGIGER APOPTOSE

Die Rekrutierung der Initiatorcaspasen Caspase-8 und Caspase-10 an den DISC wird über homotypische Interaktionen zwischen ihren DEDs und der DED von FADD vermittelt. Dieselbe homotypische Interaktion ist Grundlage für die Bindung von c-FLIP an den Signalkomplex. c-FLIP weist weitgehende Homologie zu beiden DED-enthaltenden Caspasen auf, hat allerdings keine funktionale Proteasedomäne (Goltsev *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997; Irmmler *et al.*, 1997b; Rasper *et al.*, 1998; Shu *et al.*, 1997b; Srinivasula *et al.*, 1997).

Eine Vielzahl von unterschiedlichen mRNAs wird durch differentielles Splicing aus dem Gen für c-FLIP, dem genomischen Locus *cflar*, generiert (Djerbi *et al.*, 2001). Bisher ist es jedoch nur gelungen, die endogene Expression dreier Proteinvarianten nachzuweisen (Golks *et al.*, 2005; Irmmler *et al.*, 1997b; Scaffidi *et al.*, 1999).

Die längste endogen exprimierte Variante von c-FLIP, c-FLIP_L, besitzt zwei DEDs sowie eine proteaseähnliche C-terminale Domäne, die den Proteasedomänen von Caspase-8 und Caspase-10 entspricht. Durch Austausch einzelner Aminosäuren ist das katalytische Zentrum in c-FLIP_L allerdings inaktiv. c-FLIP_L kann durch Aktivität von Caspase-8 oder -10 proteolytisch gespalten werden, was zur Entstehung eines verkürzten 43 kDa-Fragments führt (Irmmler *et al.*, 1997b; Shu *et al.*, 1997b). Zwei kurze Varianten von c-FLIP, c-FLIP_S und c-FLIP_R, werden ebenfalls endogen exprimiert. Diesen beiden Varianten fehlen die proteaseähnlichen Abschnitte des Moleküls; stattdessen haben c-FLIP_S und c-FLIP_R kurze, voneinander unterschiedliche C-Termini ohne offensichtliche Funktion oder Homologie (**Abb. 5**).

A CFLAR**B mRNA****C Proteindomänen**

▨ DED: Todeseffektordomäne
 ▩ große Proteasedomäne p20
 ▩ kleine Proteasedomäne p10
 □ Verbindende Sequenzen
 ■ Sonstige nichtfunktionelle Sequenzen

Abbildung 5. c-FLIP: Genom, mRNA und Proteine

A, genomische Struktur des *cflar*-Gens.

B, Exonzusammensetzung der bisher beschriebenen c-FLIP-mRNAs. Dreiecke bezeichnen ein Translationsstartcodon, Kreise ein Stopcodon. mRNAs, die dasselbe Protein codieren, sind mit runden Klammern zusammengefasst.

C, Domänenstruktur von c-FLIP-Proteinen. Die C-Termini von c-FLIP_S und c-FLIP_R unterscheiden sich voneinander.

In vielen experimentellen Systemen führt eine Erhöhung der Expression von c-FLIP-Isoformen zu einer Desensitivierung der Zelle gegen rezeptorvermittelte Apoptose (Hu *et al.*, 1997; Irmeler *et al.*, 1997b; Kataoka *et al.*, 1998; Rasper *et al.*, 1998; Srinivasula *et al.*, 1997). Alle drei endogen exprimierten Isoformen werden an den CD95-DISC rekrutiert und inhibieren die auto-proteolytische Prozessierung der Initiatorcaspasen (Golks *et al.*, 2005). Diese inhibitorische

Funktion von c-FLIP in der Induktion rezeptorabhängiger Apoptose ist weitgehend akzeptiert und wird durch eine Vielzahl funktioneller Experimente gestützt (Krueger *et al.*, 2001).

In einigen Fällen wurde die Induktion von Apoptose durch massive Überexpression von c-FLIP-Varianten beobachtet (Han *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997; Shu *et al.*, 1997a); dies ist jedoch vermutlich auf die stimulusunabhängige Oligomerisierung von DED-enhaltenden Proteinen zurückzuführen, die in der Ausbildung von DED-Filamenten und der Rekrutierung und Aktivierung DED-enhaltender Caspasen resultiert (Siegel *et al.*, 1998).

In vitro-Experimente deuten an, dass Heterodimere zwischen c-FLIP_L und Procaspase-8 sehr stabil sind und möglicherweise die proteolytische Aktivierung von Caspase-8 besser unterstützen als Procaspase-8-Homodimere (Boatright *et al.*, 2004; Dohrman *et al.*, 2005); einer daraus abgeleiteten proapoptotischen Rolle von c-FLIP_L widerspricht allerdings die Tatsache, dass die Sensitivität von Zelllinien gegen CD95-abhängige Apoptose erhöht wird, wenn die Expression von c-FLIP_L durch selektiv wirksame siRNA-Oligonukleotide inhibiert wird (Sharp *et al.*, 2005).

Allerdings scheint die antiapoptotische Wirkung nicht die einzige Funktion zu sein, die c-FLIP im Organismus erfüllt. Ein wichtiges Indiz für eine vermutlich nichtapoptotische Funktion von c-FLIP während der Embryonalentwicklung stammt aus der Analyse von c-FLIP-defizienten Mäusen. c-FLIP^{-/-}-Tiere sterben an Tag 10,5 der Embryonalentwicklung mit Anzeichen fehlerhafter Herzentwicklung (Yeh *et al.*, 2000). Dieser Phänotyp scheint unvereinbar mit einer rein antiapoptotischen Funktion von c-FLIP während der Embryogenese und ist dem Phänotyp von FADD- und Caspase-8-defizienten Mäusen bemerkenswert ähnlich (Varfolomeev *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 1998). Diese Defekte deuten darauf hin, dass neben Caspase-8 und FADD auch c-FLIP eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung spielt.

Hinweise auf nichtapoptotische Funktionen von c-FLIP im adulten Organismus stammen erneut aus Systemen, in denen c-FLIP artifiziell überexprimiert wird. In derartigen Systemen wurde ein positiver Effekt von c-FLIP auf die stimulationsabhängige Proliferation von T-Zellen beobachtet (Thome und Tschopp, 2001). Ferner wurde beobachtet, dass bei Überexpression von c-FLIP_L die Proteinkinase RIP1 an den CD95-DISC rekrutiert wird und Stimulation von CD95 in dieser Konstellation zu starker Aktivierung von NF- κ B führt (Chaudhary *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2000; Kataoka *et al.*, 2000). Die c-FLIP_L-abhängige Aktivierung von NF- κ B scheint von der proteolytischen Generierung des p43-Fragments abhängig zu sein (Kataoka und Tschopp, 2004). Gegen eine oft diskutierte Rolle von c-FLIP in der TCR-abhängigen NF- κ B-Aktivierung spricht allerdings die Tatsache, dass in c-FLIP-defizienten Thymocyten oder T-Lymphocyten keine Defekte in der TCR-proximalen Aktivierung von NF- κ B oder ERK zu beobachten sind (Sharp *et al.*, 2005; Zhang und He, 2005b).

2. T-Lymphocyten im menschlichen Immunsystem

2.i. Das Immunsystem

Eine der wichtigsten evolutionären Neuerungen bei der Entstehung komplexer Organismen ist die Ausbildung eines spezialisierten Organsystems, das dem Organismus die Verteidigung gegen Pathogene ermöglicht. Erst mit der Entwicklung von dedizierten Abwehrsystemen konnte die Komplexität höherer Organismen gegen die Vielzahl von potenziell schädlichen Umwelteinflüssen aufrechterhalten werden.

Unabhängig voneinander haben sich in so unterschiedlichen Gattungen wie Insekten, Reptilien und Säugetieren funktionell ähnliche Organsysteme entwickelt, deren wichtigste Aufgabe in der Beseitigung von invadierenden Mikroorganismen, Parasiten, aber auch apoptotischen, virusinfizierten oder entarteten Zellen zu bestehen scheint. Trotz der gleichartigen Funktionen, die das Immunsystem in den unterschiedlichsten Organismen erfüllen muss, unterscheiden sich die Mechanismen stark, die diese Funktionen in verschiedenen Phyla ausfüllen.

Das Immunsystem lässt sich in mehrere Ebenen unterschiedlicher Komplexität unterteilen. Epithelien fungieren als mechanische Barriere zum Schutz vor vielen Infektionen. Die zirkulierenden Serumproteine des Komplementsystems können sich auf Pathogenen ablagern und diese entweder durch Ausbildung von Membranporen direkt lysieren oder die Aktivität von zellulären Komponenten des Immunsystems durch Opsonisierung unterstützen.

Die angeborene Immunantwort wird von Zelltypen vermittelt, die extrazelluläre Pathogene durch Phagocytose aufnehmen oder durch ins extrazelluläre Milieu abgegebene Sauerstoffradikale inaktivieren können (neutrophile Granulocyten, Macrophagen). Eine zusätzliche Effektorzellpopulation, die Natürlichen Killer- (NK-) Zellen, besitzt cytotoxische Aktivität, die hauptsächlich durch das Fehlen von MHC-Molekülen der Klasse I auf infizierten Zellen ausgelöst wird.

2.ii. Die adaptive Immunantwort

2.ii.1. ANTIGENPRÄSENTATION UND -REZEPTOREN

Die Immunabwehr auf Basis angeborener Mechanismen bietet eine schnelle Möglichkeit, das Eindringen und die Vermehrung vieler Pathogene zu verhindern oder zu erschweren. Allerdings sind die Mechanismen der angeborenen Immunität durch bestimmte evolutionäre Anforderungen nur eingeschränkt wirksam. So erfolgt die Selektion und Evolution der

aktivierenden Rezeptoren auf genomischer Ebene; eine schnelle Reaktion auf die wesentlich rascher evolvierenden Pathogene ist somit nicht möglich. Auch ist die Spezifität dieser Mechanismen eingeschränkt, da eine gute Unterscheidung zwischen Körperzellen und Pathogenen gewährleistet bleiben muss, um Autoimmunität zu vermeiden.

Vor diesem Hintergrund ist die Evolution eines zellulären Immunsystems zu verstehen, in dem die Antigenspezifität nicht in der Keimbahn festgelegt ist, sondern während der Entwicklung und Reifung individueller Effektorzellen durch somatische Rekombination und Mutation entsteht. Diese somatischen, nicht keimbahnabhängigen Mechanismen erlauben eine wesentlich höhere Vielfalt an möglichen Effektor-Spezifitäten und erleichtern somit eine stringente Selektion von nicht autoreaktiven Zellen mit hoher Affinität für ein gegebenes Antigen.

2.ii.2. B- UND T-LYMPHOCYTEN

Die Akteure des adaptiven Immunsystems, B- und T-Lymphocyten, entwickeln sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle und zirkulieren durch Blut und Lymphe. Während der Reifung von B-Lymphocyten im Knochenmark erfolgt durch somatische Rekombination und weitergehende Hypermutation im Immunglobulin-Locus die Assemblierung eines funktionellen B-Zell-Rezeptors. Dieser ist ein membranständiges Immunglobulin der Klasse IgM. Die Umordnungen im Immunglobulin-Locus finden während der Reifung der B-Zelle im Knochenmark statt; B-Zellen, deren Prä-IgM-Rezeptor in diesem Stadium ein Autoantigen bindet, werden durch Apoptose eliminiert. Wird eine reife B-Zelle in der Peripherie aktiviert, differenziert sie zu einer Plasmazelle aus und teilt sich wiederholt, um so eine große klonale Population an antigenspezifischen Plasmazellen zu erzeugen. In diesen Plasmazellen findet eine Änderung des exprimierten Immunglobulin-Isotyps („isotype switching“) statt, und lösliche Immunglobuline werden als Antikörper in den Blutkreislauf sezerniert (Ollila und Vihinen, 2005).

Die Reifung von T-Lymphocyten findet im Thymus statt (**Abb. 6**). Der Antigenrezeptor von T-Lymphocyten, ebenfalls ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, durchläuft während der Entwicklung der T-Zelle somatische Rekombination und Hypermutation analog zur Immunglobulin-Rekombination in B-Lymphocyten. Auch T-Lymphocyten werden durch Apoptose eliminiert, wenn ihre Antigenrezeptoren während der Reifung effizient an körpereigene Antigene binden (Zuniga-Pflucker, 2004).

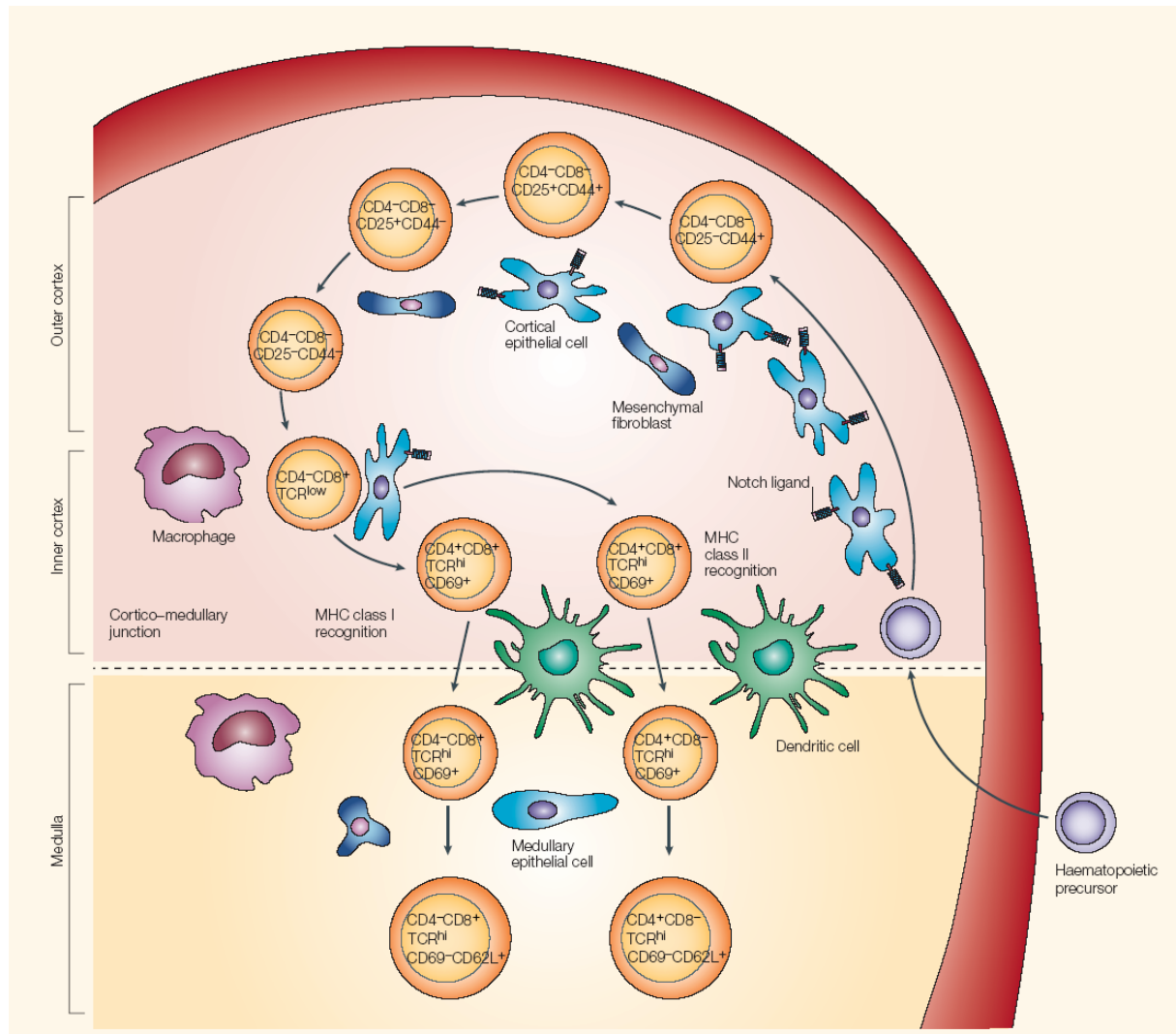


Abbildung 6. T-Lymphocyten-Entwicklung im Thymus
 Nach (Zuniga-Pflucker, 2004)

2.ii.3. ANTIGENERKENNUNG UND AKTIVIERUNG VON T-LYMPHOCYTEN

Während B-Lymphocyten ihre Antigene nativ erkennen können, richtet sich die Spezifität von T-Zell-Rezeptoren gegen prozessierte Peptide, die auf Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert werden. Die genetisch hochgradig polymorphen MHC-Moleküle – ebenfalls Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie – lassen sich in zwei Klassen unterteilen: während MHC-Moleküle der Klasse I auf allen Körperzellen exprimiert werden und zur Präsentation von Antigenen dienen, die durch proteasomabhängigen Abbau intrazellulärer Proteine gewonnen werden, finden sich MHC II-Moleküle nur auf der Oberfläche professionell antigenpräsentierender Zellen (v. a. Makrophagen und dendritische Zellen) und präsentieren Fragmente von extrazellulären Antigenen, die endocytotisch aufgenommen und im Lysosom

prozessiert wurden. Vor diesem Zusammenhang ist die Existenz von dendritischen Zellen zu verstehen, die im Gegensatz zu Makrophagen keine direkte Funktion in der Antigenabwehr haben, sondern ausschließlich zur Aufnahme und Prozessierung extrazellulärer Antigene sowie zur Präsentation dieser Antigene auf MHC II existieren. Dieser Dualität der T-Zell-Liganden entspricht die Expression der Corezeptoren CD4 und CD8 auf der Oberfläche der T-Zelle. Während der Corezeptor CD4 mit den konstanten Anteilen von MHC-Molekülen der Klasse II interagiert, kann der Corezeptor CD8 nur an MHC I binden. Die gleichzeitige Interaktion von T-Zell-Rezeptor und Corezeptor mit einem MHC-Antigen-Komplex auf der präsentierenden Zelle ist notwendig, um in der T-Zelle ein produktives Signal auszulösen (**Abb. 7**).

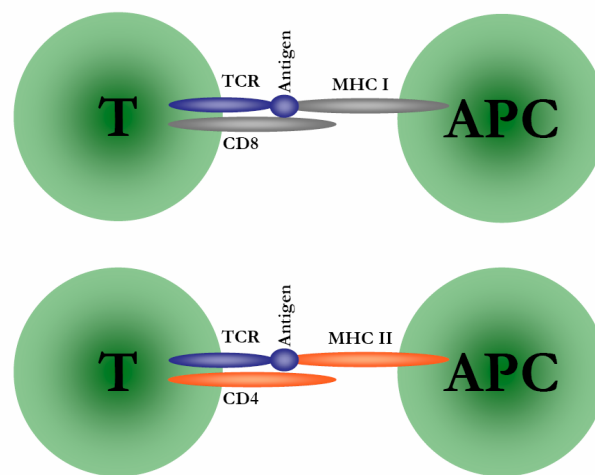


Abbildung 7. Stimulation von T-Lymphocyten

T-Zell-Stimulation hängt von zwei molekularen Interaktionen ab: während die variablen Bereiche des T-Zell-Rezeptors das MHC-präsentierte Antigen erkennen, muss eine Interaktion zwischen dem Corezeptor CD4 bzw. CD8 und den konstanten Bereichen des MHC II- bzw. MHC I-Moleküls stattfinden.

2.ii.4. T-LYMPHOCYTEN – ZELLTYPEN UND FUNKTIONEN

T-Lymphocyten lassen sich nach ihrer Corezeptor-Expression in zwei Klassen unterteilen: $CD4^+$ T-Helfer-Zellen (T_H) und $CD8^+$ cytotoxische T-Lymphocyten (CTL).

T_H -Zellen exprimieren den Corezeptor CD4, erkennen folglich Antigene, die von professionell antigenpräsentierenden Zellen auf MHC-Molekülen der Klasse II präsentiert werden. Diese Antigene repräsentieren i. d. R. extrazelluläre Pathogene. Aktivierte T_H -Zellen partizipieren im

Wesentlichen durch die Sekretion von Cytokinen und Interleukinen bei der Aktivierung von Makrophagen (T_H1) oder B-Zellen (T_H2).

Die Funktion cytotoxischer T-Lymphocyten hingegen besteht in der Eliminierung infizierter oder anderweitig veränderter Körperzellen, die nicht körpereigene Antigene auf MHC I präsentieren. Bei einer produktiven Bindung von CD8-Corezeptor und T-Zell-Rezeptor an einen Peptid-MHC-Liganden wird durch sezernierte Faktoren und Todesliganden-Expression auf der Oberfläche der T-Zelle in der Zielzelle Apoptose ausgelöst.

Neben diesen klassischen Möglichkeiten der Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung existiert ein dritter Mechanismus, der „cross-presentation“ genannt wird. Hier werden Antigene, die aus dem extrazellulären Milieu aufgenommen werden, auf MHC-Molekülen der Klasse I präsentiert. Dieser Präsentationsweg erlaubt die Generierung von $CD8^+$ Effektor-T-Lymphocyten gegen extrazelluläre Pathogene, kann aber auch periphere T-Zell-Toleranz hervorrufen (Heath und Carbone, 2001).

Zusätzlich zu diesen grundlegenden Effektor-Zelltypen wird die Existenz von regulatorischen T-Zellen diskutiert, die durch Suppression autoreaktiver T-Lymphocyten in der Peripherie einen weiteren Mechanismus der Selbsttoleranz darstellen sollen. Die Zellpopulation, die im Zusammenhang mit diesen regulatorischen Eigenschaften derzeit die meiste Aufmerksamkeit erfährt, ist $CD4^+$ und exprimiert die hochaffine α -Kette des IL-2-Rezeptors, CD25 (Sakaguchi, 2005).

Zur Einleitung einer T-Zell-Immunantwort ist die Interaktion zwischen einer naiven T-Zelle und einer spezialisierten antigenpräsentierenden Zelle notwendig, die ein Antigen präsentiert, das den jeweiligen T-Zell-Rezeptor binden kann. Die Wahrscheinlichkeit einer solchen produktiven Interaktion wird dadurch erhöht, dass antigenpräsentierende Zellen nach der Aufnahme von Antigenen in die peripheren lymphatischen Organe migrieren. T-Zellen wiederum verlassen regelmäßig die Zirkulation und durchwandern diese Organe. Findet keine Interaktion mit einer antigenpräsentierenden Zelle statt, werden die T-Zellen über die efferenten lymphatischen Gefäße ins Blut zurücktransportiert; kommt es jedoch zur Stimulation einer T-Zelle durch ein präsentiertes Antigen, wird die T-Zelle aktiviert und beginnt zu proliferieren. Die Tochterzellen differenzieren zu Effektor-T-Zellen und eine T-Zell-Immunantwort wird eingeleitet (Van den Eertwegh *et al.*, 1992).

2.iii. Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors

Die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors durch MHC-präsentierte Liganden ist ein komplexer Prozess, der eine Vielzahl von intrazellulären Signaltransduktionsprozessen in Gang setzt. Diese sollen im Folgenden beschrieben werden.

2.iii.1. DER T-ZELL-REZEPTOR IST EIN MULTIMERER KOMPLEX AUS MEMBRANPROTEINEN

Es wurde bereits erwähnt, dass der T-Zell-Rezeptor aus zwei Ketten besteht, deren Antigenpezifität durch genomische Rekombination und somatische Hypermutation erzeugt wird. Im Folgenden soll auf die Signaltransduktion von T-Lymphocyten eingegangen werden, deren Antigenrezeptor aus einer α - und einer β -Kette besteht. Diese α/β -T-Lymphocyten treten in der Peripherie auf und wurden funktionell eingehend charakterisiert.

Der Antigenrezeptor besteht aus mindestens sechs Untereinheiten: zusätzlich zu α - und β -Kette, die die Antigenpezifität bestimmen, liegen in einem membranständigen Komplex die Untereinheiten CD3 γ , - δ , - ϵ und - ζ vor. Sie bilden Heterodimere der Form CD3 γ ·CD3 ϵ und CD3 δ ·CD3 ϵ sowie CD3 ζ -Homodimere. Im Gegensatz zu TCR- α - und β -Kette, die kurze cytoplasmatische Domänen haben, weisen die konstanten CD3-Ketten des TCR-Komplexes lange cytoplasmatische Bereiche auf, in denen sich Tyrosinphosphorylierungsmotive finden, die ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) genannt werden (**Abb. 8**) (Pitcher und van Oers, 2003).

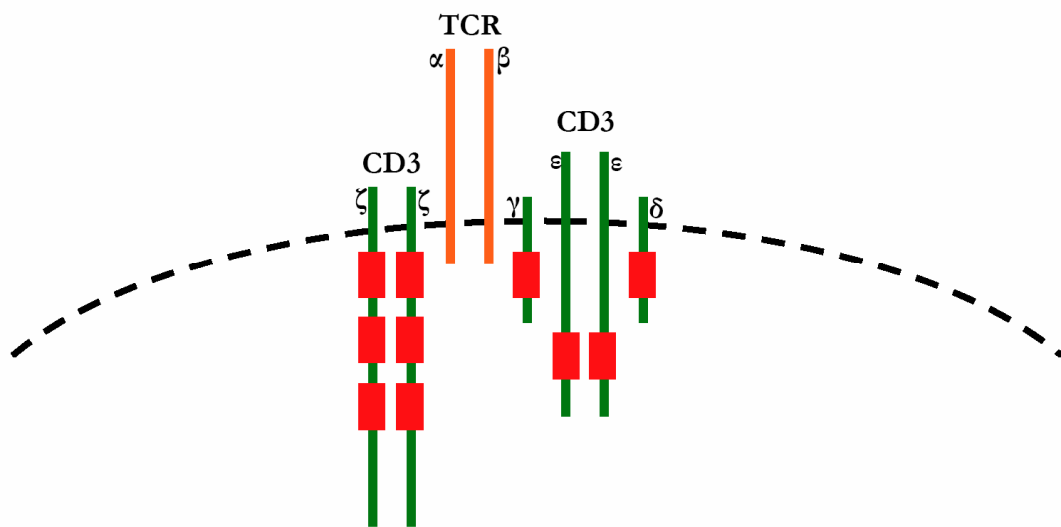


Abbildung 8. Der T-Zell-Rezeptorkomplex

Der T-Zell-Rezeptor, ein Heterodimer aus α- und β-Kette, liegt in der Zellmembran als Komplex mit den signalübertragenden CD3-Untereinheiten CD3γ, -δ, -ε und -ζ vor. Die ITAMs (rot dargestellt), die für die Übertragung des TCR-Signals in das Cytoplasma essentiell sind, befinden sich in den cytoplasmatischen Domänen der CD3-Untereinheiten.

2.iii.2. ADAPTERPROTEINE UND PROTEINKINASEN SIND FÜR DIE ÜBERTRAGUNG DES TCR-SIGNALS ESSENTIELL

Bei Stimulation des TCR durch Peptid-MHC-Komplexe werden Protein-Tyrosinkinasen der Src-Familie an den TCR-Komplex rekrutiert und aktiviert (**Abb. 9**). Diese Kinasen, Fyn und Lck, phosphorylieren die ITAMs in den CD3-Ketten des TCR-Komplexes, der in Membran-Mikrodomänen transloziert, die als „lipid rafts“ bezeichnet werden (Razaq *et al.*, 2004).

An die phosphorylierten ITAMs binden weitere Protein-Tyrosinkinasen der Syk-Familie, deren best charakterisierter Vertreter das Protein ZAP-70 ist (van Oers und Weiss, 1995). Die Bindung von ZAP-70 an die phosphorylierten ITAMs erfolgt mittels zweier SH2-Domänen (SH2 = Src homology domain 2, ein konserviertes Bindemotiv für phosphorylierte Tyrosine). Nach Rekrutierung an den TCR-Komplex wird ZAP-70 ebenfalls durch Lck phosphoryliert und damit aktiviert.

Zu den Substraten von ZAP-70 zählen die Adapterproteine Lat und SLP-76 (Clements *et al.*, 1999). Lat ist ein Transmembranprotein, das konstitutiv in lipid rafts lokalisiert ist. In der cytoplasmatischen Domäne von Lat befinden sich mehrere Tyrosinreste, die nach Phosphorylierung mit mehreren Adapter- und Signalproteinen interagieren. Für die TCR-

Signaltransduktion wichtige Interaktionspartner von tyrosinphosphoryliertem Lat sind das Adapterprotein GADS, das SLP-76 in den Komplex rekrutiert, das Adapterprotein Grb2, das an das Protein Sos bindet, und Phospholipase $\text{C}\gamma 1$. SLP-76 ist ein cytoplasmatisches Adapterprotein, zu dessen Interaktionspartnern der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) Vav und der Adapter Nck zählen (Clements *et al.*, 1999).

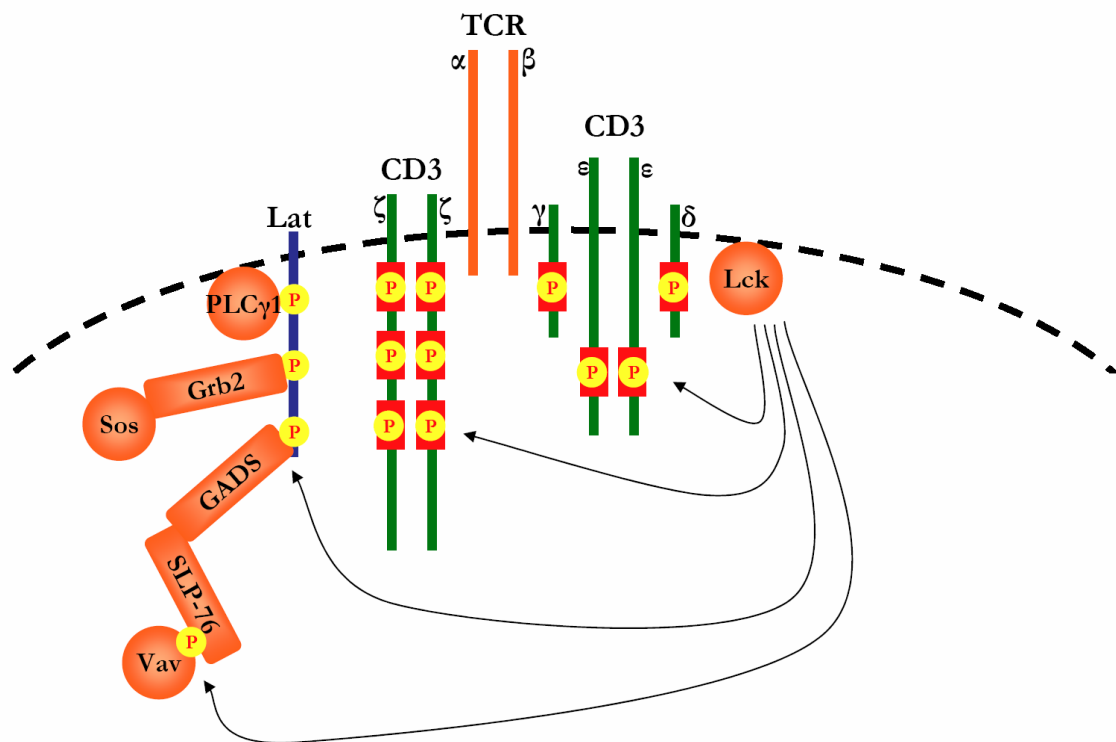


Abbildung 9. Frühe Ereignisse in der TCR-Signaltransduktion

Die Tyrosinkinase Lck wird nach Aktivierung an den TCR-Komplex rekrutiert und phosphoryliert die ITAMs der CD3-Komponenten. Dies führt zu Rekrutierung von Lat, welches ebenfalls durch Lck phosphoryliert wird. Anschliessend rekrutiert Lat die Lipidhydrolase PLCγ1 und die Adapterproteine Grb2 und GADS, welches die Bindung des Adapterproteins SLP-76 an den Komplex ermöglicht. Nach Phosphorylierung durch Lck rekrutiert SLP-76 den GEF Vav. Enzyme werden durch Kreise, Adapterproteine durch Rechtecke symbolisiert.

2.iii.3. INTRAZELLULÄRE TCR-ABHÄNGIGE SIGNALTRANSDUKTIONSVORGÄNGE

Nach Assemblierung dieses TCR-Signalkomplexes werden cytoplasmatische Signaltransduktionsprozesse initiiert, die in der Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren kulminieren (**Abb. 10**). Ausgangspunkte für diese Signalwege sind die Moleküle PLCγ1, Sos und Vav.

Die Phospholipase $\text{C}\gamma 1$ (**PLCγ1**) katalysiert die Hydrolyse des phosphorylierten Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat

(IP₃) (Wilde und Watson, 2001). Diese Reaktionsprodukte agieren als „second messenger“. IP₃ bindet an ligandabhängige Ionenkanäle im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und verursacht einen Einstrom von Ca²⁺-Ionen in das Cytoplasma. Dieser primäre Einstrom ist gefolgt von einer weitaus stärkeren Erhöhung der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration, die durch Ca²⁺-abhängige Ca²⁺-Kanäle in der Zellmembran ausgelöst wird (Lewis, 2001). Die erhöhte zelluläre Ca²⁺-Konzentration führt über Aktivierung der Phosphatase Calcineurin zu Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT und dessen Translokation in den Zellkern (**Abb. 10**). Außerdem scheint der Ca²⁺-Einstrom eine anhaltende Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie zu verursachen (Dolmetsch *et al.*, 1997).

Der zweite second messenger, der von PLC γ 1 generiert wird, ist DAG. Dieses aktiviert die Proteinkinase C θ (PKC θ) (Isakov und Altman, 2002). PKC θ ist eine Serin-/Threonin-Proteinkinase, deren direkte Substrate in der T-Zell-Signaltransduktion nicht zweifelsfrei identifiziert sind. Aktivität von PKC θ trägt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der AP-1- und NF- κ B-Familien bei (Isakov und Altman, 2002). Die Aktivierung von AP-1 scheint von einer Aktivierung der Proteinkinasen JNK1 und MKK4 abzuhängen (Werlen *et al.*, 1998). PKC θ -abhängige NF- κ B-Aktivität scheint durch Aktivierung des IKK-Komplexes vermittelt zu werden (Isakov und Altman, 2002).

Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor **Sos** katalysiert die Aktivierung der kleinen GTPase Ras durch Bindung von GTP. Durch Bindung von aktivem Ras wird die Proteinkinase Raf-1 aktiviert. Aktivierung von Raf-1 führt zu Aktivität der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK1 und -2 (extracellular signal-regulated kinase), die durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Fos zur Aktivität von AP-1-Transkriptionsfaktoren beitragen (**Abb. 10**).

Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor **Vav** ist analog zu Sos an der Aktivierung der kleinen GTPase Rho beteiligt. Rho ist beteiligt an Umstrukturierungen des Cytoskeletts, die zur Polarisierung der T-Zelle („receptor capping“) und Ausbildung der immunologischen Synapse notwendig sind (Fischer *et al.*, 1998). Außerdem ist Vav durch Aktivierung der GTPase Rac an der Aktivierung der Lipidkinase PI3K beteiligt (Deane und Fruman, 2004). PKB/Akt, eine Kinase, die in Abhängigkeit von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat aktiviert wird, trägt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie bei (Deane und Fruman, 2004).

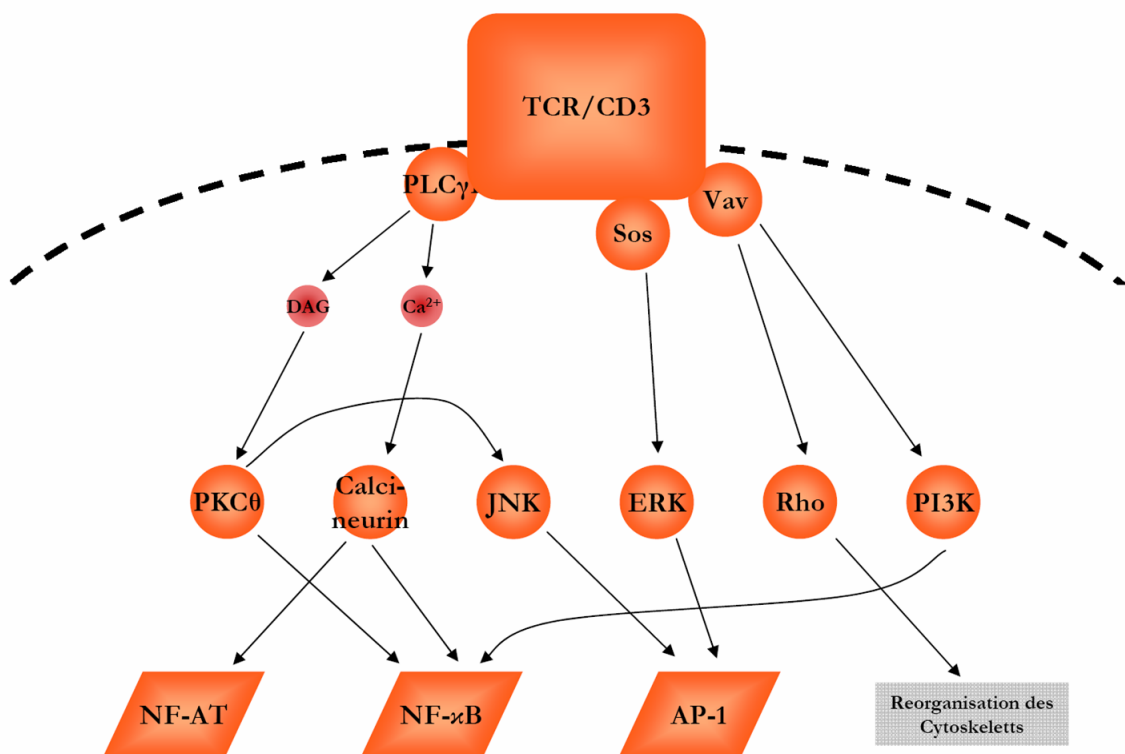


Abbildung 10. Signaltransduktion jenseits des TCR-Signalkomplexes

Schematische Darstellung der intrazellulären Signaltransduktionsvorgänge, die durch TCR-Ligation ausgelöst werden. Große Kreise symbolisieren Enzyme, kleine Kreise second messenger, Rauten Transkriptionsfaktoren. Details s. Text.

2.iii.4. MÖGLICHKEITEN DER *IN VITRO*-STIMULATION VON T-LYMPHOCYTEN

Die Stimulation von T-Lymphocyten *in vitro* kann durch unterschiedliche Manipulationen erreicht werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden sollen hier verglichen werden.

OKT3 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen den CD3-Komplex gerichtet ist. Durch Multimerisierung gebundener Antikörpermoleküle kann ein TCR-Signal initiiert werden. Die Multimerisierung wird entweder durch Inkubation von Zellen mit löslichem OKT3 und einem kreuzvernetzenden anti-Maus-IgG-Antikörper erreicht, oder durch Inkubation von Zellen in Zellkulturgefäßen, deren Plastikoberfläche zuvor mit Antikörpermolekülen beschichtet wurde.

Das Lectin Phytohemagglutinin bindet glykosylierte Proteine auf der Zellmembran, darunter Komponenten des CD3-Komplexes. Durch diese Bindung wird ebenfalls eine Oligomerisierung von TCR-Komplexen und somit ein TCR-Signal eingeleitet.

Im Gegensatz zu diesen beiden Methoden, die den endogen vorhandenen Rezeptorkomplex zur Stimulation ausnutzen, ist die pharmakologische Stimulation von T-Lymphocyten ein rein intrazellulärer Vorgang. Durch den Phorbolster PMA werden DAG-abhängige Isoformen von

PKC aktiviert, darunter PKC θ . Gleichzeitig wird durch das Ionophor Ionomycin ein Ca²⁺-Einstrom aus dem extrazellulären Milieu erreicht. Die Behandlung von T-Lymphocyten mit PMA und Ionomycin erlaubt es also, die wichtigsten Signalwege zu stimulieren, die durch TCR-Stimulation auch aktiviert werden (Takahama und Nakauchi, 1996). Notwendig ist diese Art der pharmakologischen Stimulation häufig bei Experimenten mit Zelllinien, da diese sich oft durch verringerte Expression von TCR und CD3-Proteinen auszeichnen.

2.iv. Aktivierungs-Induzierter Zelltod von T-Lymphocyten

2.iv.1. DIE APOPTOSESENSITIVITÄT VON T-LYMPHOCYTEN IST STRENG REGULIERT

Naive T-Lymphocyten werden *in vivo* durch Stimulation mit ihrem kognaten TCR-Liganden aktiviert und beginnen zu proliferieren (**Abb. 11**). Die aktivierten T-Lymphocyten, die in dieser klonalen Expansion entstehen, sind in der Lage, ihre cytotoxische oder sekretorisch-costimulatorische Effektorfunktion auszuführen.

Nach Beendigung der Immunantwort werden die klonal expandierten T-Lymphocyten durch Apoptose aus dem Organismus entfernt. Die Apoptose, die in diesem Stadium stattfindet, ist hauptsächlich von erneuter Stimulation des T-Zell-Rezeptors in Abwesenheit costimulatorischer Signale (z. B. durch Liganden der Corezeptoren CD28 oder ICOS) abhängig. Zu einem gewissen Anteil lässt sich dieser Aktivierungs-Induzierte Zelltod (AICD) durch CD95-Antagonisten inhibieren; mechanistische Untersuchungen zeigten eine transkriptionelle Induktion von CD95L, die zu para- und autokriner Stimulation von CD95 führt. Ähnliche Effekte lassen sich in der T-Zelllinie Jurkat beobachten, wenn die Zellen durch monoklonale Antikörper oder mit pharmakologischen Mitteln stimuliert werden.

In einem *in vitro*-Modell können diese Ereignisse simuliert werden (**Abb. 11**): primäre humane T-Zellen werden polyklonal durch Zugabe des Lectins Phytohemagglutinin (PHA) über Nacht stimuliert und anschließend für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen in der Gegenwart von Interleukin-2 kultiviert. Nach der initialen Stimulation sind die T-Zellen resistent gegen CD95-induzierte Apoptose. Während der Kultivierungsphase in Anwesenheit von IL-2 findet starke Proliferation der T-Lymphocyten statt (Klas *et al.*, 1993).

Am Ende dieser Expansionsphase wird durch erneute Stimulation der T-Zellen mit agonistischen, monoklonalen Antikörpern gegen CD3 CD95-abhängige Apoptose ausgelöst; die Sensitivität der T-Zellen gegen CD95 ist in diesem Stadium deutlich erhöht. Eine detaillierte Analyse der CD95-Signaltransduktion in diesem Modell ergab, dass sich primäre T-Zellen nach Isolation und primärer Stimulation wie CD95 Typ II-Zellen verhalten, die durch starke

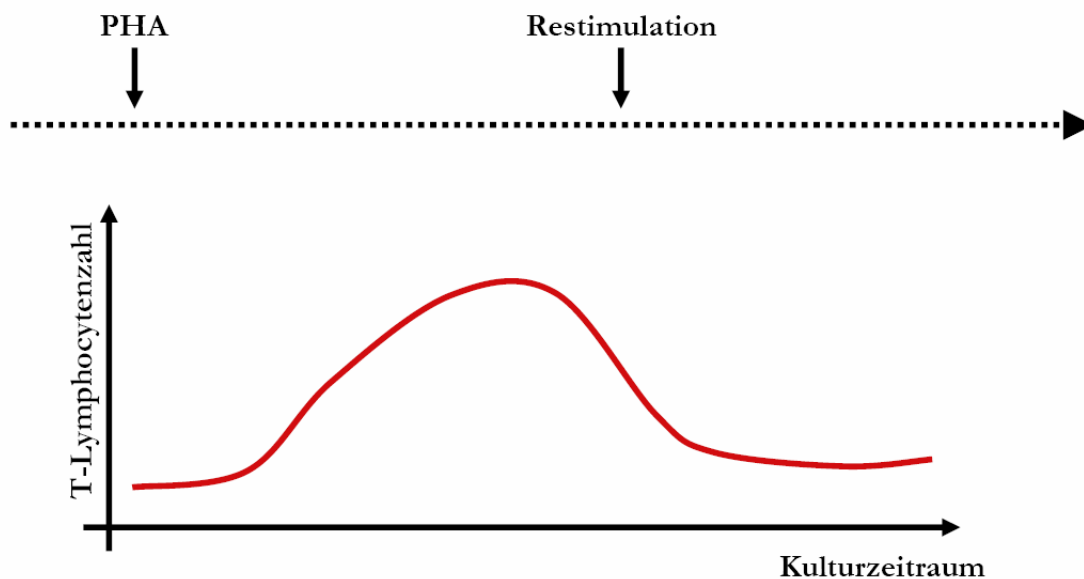


Abbildung 11. Verlauf einer T-Zell-Immunantwort und *in vitro*-Modell

Im Verlauf einer T-Zell-Immunantwort beobachtet man nach einer initialen TCR-Stimulation die Expansion antigenspezifischer Zellen. Nach einiger Zeit nimmt die Zellzahl durch Deletionsprozesse wieder ab (unten). Diese Prozesse werden *in vitro* simuliert (oben): die initiale Stimulation erfolgt über Nacht mit 2 µg/ml PHA. Nach 5 bis 6 Tagen in IL-2-haltigem Medium kann durch Restimulation des TCR CD95-abhängige Apoptose ausgelöst werden.

Expression von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen gegen die Induktion von Apoptose geschützt sind. In Abhängigkeit von exogen zugegebenem IL-2 verändert sich im Lauf der Kulturperiode der Phänotyp zu CD95 Typ I (Schmitz *et al.*, 2003). Durch diese Verschiebung des Phänotyps kann davon ausgegangen werden, dass während der Deletionsphase der Immunantwort die Sensitivität von T-Zellen gegen AICD hauptsächlich am CD95-DISC reguliert wird.

Ein alternatives Modell für die Initiierung von AICD ergibt sich aus Beobachtungen an transgenen Mäusen. So akkumulieren CD95- oder CD95L-defiziente Mäuse nicht aktivierte T-Lymphocyten in der Peripherie, sondern eine CD4⁺CD8⁺B220⁺ Population (Roths *et al.*, 1984). Hingegen ist die Deletion aktivierter T-Lymphocyten zur Beendigung einer Immunantwort in Mäusen eingeschränkt, in denen die proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bim, Bax oder Bak inaktiviert wurden (Davey *et al.*, 2002; Hildeman *et al.*, 2002; Lindsten *et al.*, 2000; Strasser *et al.*, 1991; Strasser *et al.*, 2000b; Wei *et al.*, 2001).

Zu den molekularen Ursachen der unterschiedlichen Sensitivität von T-Zellen unterschiedlicher Aktivierungsstadien gegen so verschiedene proapoptotische Stimuli wie TCR-Ligation oder Stimulation der Todesrezeptoren CD95, DR4 oder DR5 wurden diverse Studien erstellt. Eine IL-2-abhängige Verringerung der c-FLIP-Expression in den Tagen nach der primären Stimulation

wurde beschrieben (Refaeli *et al.*, 1998), ist aber noch umstritten, da sie in anderen Modellen nicht bestätigt werden konnte (Krueger *et al.*, 2001).

Ungeachtet möglicher regulatorischer Effekte im Zeitraum nach der primären Stimulation wurde in diesen Systemen eine deutliche Induktion der Expression von c-FLIP und Bcl-x_L als unmittelbare Reaktion auf Stimulation des T-Zell-Rezeptors festgestellt (Kirchhoff *et al.*, 2000a). Durch Inhibitionsexperimente wurden erste Hinweise auf eine Beteiligung von Phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K)-abhängigen Signalwegen sowie auf eine mögliche Bedeutung von Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie gefunden (Micheau *et al.*, 2001; Panka *et al.*, 2001a). So wurde eine Verringerung der Expression von c-FLIP bei Inhibition von PI3K oder PKB/Akt mehrfach demonstriert (Panka *et al.*, 2001b; Suhara *et al.*, 2001; Uriarte *et al.*, 2005). Liegt ein costimulatorisches Signal über einen der Rezeptoren CD28 oder CD137 während der Restimulation aktivierter T-Lymphocyten vor, beobachtet man eine Reduktion des AICD, die begleitet wird von erhöhter Expression der Proteine Bcl-x_L und c-FLIP (Kirchhoff *et al.*, 2000b; Starck *et al.*, 2005). Im Falle von CD137-Costimulation wurde durch Inhibitionsstudien ebenfalls eine Abhängigkeit von PI3K-Signaltransduktion demonstriert (Starck *et al.*, 2005). Weitere Studien in Lymphocyten deuteten des Weiteren an, dass die Expression von c-FLIP und Bcl-x_L durch Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie reguliert wird (Kreuz *et al.*, 2001; Micheau *et al.*, 2001). Zusätzlich kann man in den Phasen der Resensitivierung eine Erhöhung der zellulären Expressionsniveaus von proapoptotischen Bcl-2-Proteinen wie Bcl-x_S oder Bim_{EL} beobachten (Bosque *et al.*, 2005).

2.iv.2. c-FLIP ALS REGULATOR DER APOPTOSESENSITIVITÄT PRIMÄRER T-LYMPHOCYTEN

T-Lymphocyten entsprechen während der primären Stimulation CD95 Typ II-Zellen, während der Deletionsphase verhalten sie sich wie Typ I-Zellen. Sowohl während der primären als auch während der sekundären Stimulation lässt sich allerdings feststellen, dass nach Ligation des T-Zell-Rezeptors die Sensitivität gegen CD95-vermittelte Apoptose abnimmt (Kirchhoff *et al.*, 2000a; Klas *et al.*, 1993; Schmitz *et al.*, 2003).

Potenzielle Determinanten dieser Resistenz sind c-FLIP und das antiapoptotische Bcl-2-Protein Bcl-x_L, deren Expression nach TCR-Stimulation induziert wird. Während Bcl-x_L die Apoptosesensitivität von Typ II-Zellen reduzieren kann und somit ein möglicher Resistenzfaktor in primär stimulierten T-Lymphocyten wäre, kann ein erhöhtes Expressionsniveau von c-FLIP wegen seiner DISC-inhibitorischen Funktion sowohl CD95 Typ I- als auch CD95 Typ II-Zellen vor der Induktion von Apoptose schützen.

Neben den bereits erwähnten Studien, die eine Korrelation zwischen der Apoptosesensitivität von T-Lymphocyten und der NF- κ B- oder PI3K-abhängigen Expression von c-FLIP und Bcl-x_L zeigten, wurde in anderen Untersuchungen gezeigt, dass T-Lymphocyten durch Behandlung mit metabolischen Inhibitoren wie Cycloheximid, einem Inhibitor des eukaryotischen Translationsapparats, gegen CD95-vermittelte Apoptose sensitiviert werden können (Fulda *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2004). Diese Sensitivierung ist möglicherweise zu erklären durch den Verlust kurzlebiger Proteine, zu denen sowohl c-FLIP als auch Bcl-x_L gehören. Außerdem wurde gezeigt, dass in T-Lymphocyten durch Transfer von zellpermeablem c-FLIP eine transiente Resistenz gegen CD95-Ligation hervorgerufen werden kann.

Zusätzlich zu diesen indirekten Studien wurde unlängst in transgenen Tiermodellen die relative Bedeutung von c-FLIP und Bcl-x_L in der Lymphocytenhomöostase genauer analysiert. Wird in Mäusen das *bcl-x*-Gen selektiv in T-Lymphocyten inaktiviert, ist in diesen Mäusen kein Effekt auf den Verlauf von CD4⁺- oder CD8⁺-abhängigen Immunreaktionen zu beobachten (Zhang und He, 2005a). Im Gegensatz hierzu ist in Mäusen mit einer T-Lymphocyten-spezifischen Deletion des *cflar*-Gens die Entwicklung von T-Lymphocyten im Thymus unterbrochen (Zhang und He, 2005b). Mäuse mit diesem Gendefekt weisen kaum periphere T-Lymphocyten auf. Die Proliferation von Thymocyten nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors ist unterbrochen, auch ist in diesen Thymocyten keine Expression von Aktivierungsmarkern wie CD25 oder Sekretion des Cytokins IL-2 zu beobachten. Interessanterweise ist in *cflar*-defizienten Thymocyten die TCR-abhängige Aktivierung von ERK- und NF- κ B-Signaltransduktionsmechanismen nicht verändert, obwohl andere Studien dies nahe legen würden (Kataoka und Tschopp, 2004). Der Aktivierungsdefekt ist vielmehr auf die stark erhöhte Sensitivität der Thymocyten gegen CD95-abhängige Apoptose zurückzuführen. Als direkte Folge dieser erhöhten Sensitivität werden alle Thymocyten, die ein produktives TCR-Signal erhalten, durch Aktivierungs-Induzierten Zelltod eliminiert. Diese Ergebnisse unterstreichen die prominente Rolle von c-FLIP in der Regulation der Apoptosesensitivität von Thymocyten und T-Lymphocyten.

3. Fragestellung

Bisherige Untersuchungen demonstrierten eine wichtige Funktion von c-FLIP in der T-Lymphocytenhomöostase. In verschiedenen experimentellen Systemen wurde demonstriert, dass die Expression von c-FLIP nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors induziert wird. *In vitro* und *in vivo* wurde gezeigt, dass der Verlust von c-FLIP T-Lymphocyten und Thymocyten gegen todesrezeptorvermittelte Apoptose sensitivieren und Aktivierungs-Induzierten Zelltod steigern

kann. Überexpression von c-FLIP hingegen verringert die Sensitivität von T-Lymphocyten und Thymocyten gegen todesrezeptorvermittelte Apoptose und Aktivierungs-Induzierten Zelltod.

In inhibitorbasierten Studien wurde gezeigt, dass die Expression von c-FLIP von NF- κ B-abhängiger Signaltransduktion beeinflusst wird. Des Weiteren scheint die c-FLIP-Expression von PI3K und ERK moduliert zu werden. Einige Studien lassen vermuten, dass in CD28-costimulierten T-Lymphocyten selektive Induktion der kurzen Splicevariante von c-FLIP vorliegt – auch dies scheinbar abhängig von NF- κ B-Signaltransduktion.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Signalwege genauer charakterisiert werden, die zur Expression von c-FLIP nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors führen. Zu diesem Zweck soll in primären humanen T-Zellen und transformierten T-Zelllinien die c-FLIP-Expression vor und nach TCR-Ligation untersucht werden. Durch Verwendung von Signaltransduktionsinhibitoren sollen Hinweise auf die relevanten regulatorischen Ereignisse gewonnen werden. Schließlich soll der Promoterbereich des *cflar*-Gens identifiziert und charakterisiert werden. Identifikation und Analyse der TCR-responsiven Elemente sollen sich anschließen.

Material und Methoden

Alle Experimente, die in der vorliegenden Arbeit präsentiert werden, wurden in Laboratorien der Sicherheitsstufen S1 und S2 mit laborüblicher Standardausstattung durchgeführt. Chemikalien wurden von laborüblichen Lieferanten bezogen. Bezugsquellen von Chemikalien und Geräten werden nur dann gesondert angegeben, wenn diese Informationen für den Ausgang des Experiments von Bedeutung sein können.

1. Material

1.i. Zelllinien

Jurkat ist eine Lymphomzelllinie, die 1977 aus dem Blut eines Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie etabliert wurde (Schneider *et al.*, 1977). Aus dieser ursprünglich JM genannten Zelllinie wurde durch Subklonierung der hier verwendete Klon J27 etabliert.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen sedimentiert und zu einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml in FCS / 10% DMSO aufgenommen. Aliquots von 1 ml wurden nach langsamem Abkühlen bis auf -80 °C über flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Kryokonserven wurden aus dem Stickstoff direkt in ein 37 °C-Wasserbad überführt und schnell aufgetaut. Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die Zellen mit 50 ml RPMI / 10% FCS versetzt und abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in der üblichen Zelldichte kultiviert.

1.ii. Inhibitoren und Pharmaka

Zur Stimulation von T-Lymphocyten wurden der Phorbolester PMA (Phorbol-12-myristat-12-acetat) und das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin benutzt. Diese beiden Substanzen wurden, wie auch die Signaltransduktionsinhibitoren PD 98059, U 0126, LY 294002, Wortmannin, Cyclosporin A und FK 506 / Rapamycin von Merck bezogen. Die metabolischen Inhibitoren Cycloheximid und Actinomycin D wurden bei Sigma gekauft, und der Caspaseninhibitor zVAD-fmk stammte von Bachem.

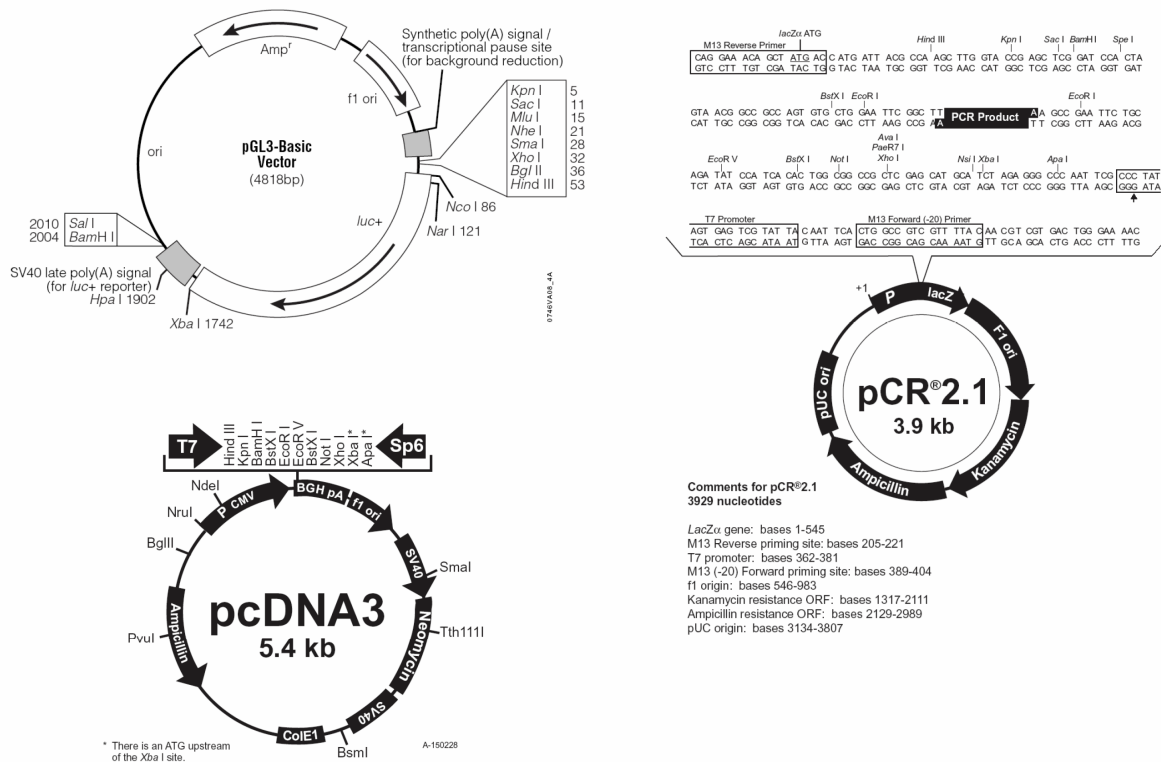


Abbildung 12. Vektoren

Die oben abgebildeten Vektoren wurden als Ausgangsbasis für die in dieser Arbeit beschriebenen Klonierungen genommen. Der Luciferase-Expressionsvektor pGL3-Basic (Promega) codiert die Luciferase von *Photinus pyralis*. Die Vektoren pcDNA3 und pCR2.1 (Invitrogen) wurden als Intermediärvektoren bei Klonierungen eingesetzt. Plasmidkarten: www.promega.com / www.invitrogen.com

1.iii. Antikörper, Plasmide und Oligonukleotide

In Western Blot-Analysen wurden folgende Antikörper verwendet: anti-c-FLIP mAb NF6 (Scaffidi *et al.*, 1999), anti- α -Tubulin mAb Klon B-5-1-2 (Sigma).

In Klonierungsexperimenten wurden als Ausgangsbasis folgende Plasmide verwendet: die Klonierungsvektoren pCR2.1 und pcDNA3 (Invitrogen) und der Luciferase-Reportervektor pGL3 (Promega).

Die Reporterplasmide pLucNF-AT und pLucNF- α B wurden bereits beschrieben (Proksch *et al.*, 2005).

In PCR- und Klonierungsexperimenten wurden folgende Oligonukleotid-Primer eingesetzt:

Tabelle 1: verwendete Oligonukleotide

PCR	<i>Forward-Primer</i>	<i>Reverse-Primer</i>
RT-PCR G3PDH	GGTGAAGGTCGG- AGTCAACGGA	GAGGGATCTCGC- TCCTGGAAGA
RT-PCR c-FLIP _L (alle Varianten)	TACATGGGCCGA- GGCAAGATAA	ATAGCCCAGGGA- AGTGAAGGTGTC
RT-PCR c-FLIP _S (alle Varianten)	ACCCTCACCTTG- TTTCGGACTAT	CCAAGAATTTTC- AGATCAGGACAA
RT-PCR c-FLIP Transkripte Ex1 → Ex3	TTTCGGTTTCTT- TGCCTCCATC	AAAGCCAGCAGG- CAGTCAACTT
RT-PCR c-FLIP Transkripte Ex2 → Ex3	CCCAGAAGGAAA- GAGCCCAGA	AACAGAAAGCCA- GCAGGCAGT
RT-PCR c-FLIP _R Transkript mit Ex1	TTTCGGTTTCTT- TGCCTCCATC	TCATGCTGGGATTC- CATATGTTTTC
RT-PCR c-FLIP _R Transkript mit Ex2	CCCAGAAGGAAA- GAGCCCAGA	TCATGCTGGGATTC- CATATGTTTTC
RT-PCR CD95L	ATAGGATCCATGTTTCTGC- TCTTCCACCTACAGAAGGA	ATAGAATTCTGACCAAGAG- AGGCTCAGATACGTTGAC
Klonierung pFLIP(1)	TGGGAAAGGAAAA- GTAATCATAGTTTG	CTAGCTCCGGGAG- TCCCTTTTA
Klonierung pFLIP(2)	GGGTCTAGTTAAAA- CAATTTTACAGAAGT	TTTCTCCCCCAAGTGTTTC
Mutagenese pFLIP(2) NF-κB-Element	TTCTAGAATTTTAAA- TTAATTCAACTTAACT	GAGTTAAGTTGAATTAA- TTTAAAATTCTAGA
Mutagenese pFLIP(2) NF-AT-Element	TGACTTCTGCAA- GAGAAATGAA	CAGATCTTTTCTCCCC- CAAGTGTTTTCAGCAGTT- TACTTCCTTCTAGCC

1.iv. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

LB-Flüssigmedium (1 l)

10 g	NaCl
10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt

Das Medium wurde autoklaviert und direkt vor Verwendung mit dem gewünschten Selektionsantibiotikum (i. d. R. Ampicillin, 50 µg/ml oder Kanamycin, 30 µg/ml) versetzt.

Zur Erzeugung von LB-Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 20 g Agar zugesetzt.

Triton X-100-Lysepuffer

20 mM	Tris, pH 7,4
137 mM	NaCl
10%	Glycerol
1%	Triton X-100
2 mM	EDTA
1×	Complete™ Protease-Inhibitoren (Roche)

1× TAE

40 mM	Tris
20 mM	Essigsäure
1 mM	EDTA
pH	8,3

1× PBS

137 mM	NaCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2,7 mM	KCl
2 mM	KH ₂ PO ₄

1× TE

10 mM	Tris
1 mM	EDTA
pH	7,4

Luciferase-Reagenz

470 µM	Luciferin (<i>Photinus pyralis</i>), Kaliumsalz
1,07 mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ · 5 H ₂ O
20 mM	Tricin
2,67 mM	MgSO ₄
100 µM	EDTA
33,3 mM	DTT
270 µM	Acetyl-CoA
530 µM	ATP
Lagerung bei -80 °C	

20× SSC

3 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat
pH	7,0

2. Methoden

Im Folgenden werden die experimentellen Techniken kurz beschrieben, die zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden. Bei Routinetätigkeiten, die mit Hilfe gut etablierter, kommerziell erhältlicher Kits durchgeführt wurden, sei auf die Dokumentation des jeweiligen Herstellers verwiesen.

2.i. Zellkultur

Jurkat T-Zellen wurden in RPMI 1640, ergänzt um 10% hitzeinaktiviertes Fötale Kälberserum sowie 2 mM Glutamax-I™, bei einer Zelldichte von 2-5×10⁵ Zellen/ml kultiviert und jeden zweiten Tag durch Zugabe von frischem Medium gesplittet.

2.ii. Isolation und Kultivierung primärer humaner T-Lymphocyten

Primäre humane T-Lymphocyten wurden aus peripherem Blut isoliert. Dazu wurde das Blut bei der Entnahme mit Heparin (5000 I.E., Braun, Melsungen) versetzt. Je 15 ml einer isotonen Biocoll-Lösung (Dichte = 1,077 g/ml, Biochrom KG) wurden mit 30 ml Blut überschichtet. Thrombocyten und Erythrocyten wurden durch Zentrifugation (20 min bei 1200 g, 20 °C) von den mononukleären Zellen getrennt. Diese wurden zweimal mit PBS gewaschen und in RPMI mit 10% FCS und 2 mM Glutamax-ITM resuspendiert. Adhärenente Zellen wurden durch liegende Inkubation von mindestens 1,5 Stunden im Zellkulturbrutschrank depletiert. Nichtadhärenente Zellen wurden mit RPMI / 10% FCS / 2 mM Glutamax-ITM auf 8×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Für die anschließende Rosettierung wurden Schafserythrocyten aus frischem Schafsblut abzentrifugiert und 15 min bei 37 °C mit einer Lösung von 0,5 g 2-Aminoethylisothiuroniumbromid in 12,5 ml Wasser (pH = 9,0) inkubiert. Die Erythrocyten wurden anschließend mehrfach gewaschen und als 2-prozentige Suspension in RPMI / 10% FCS / 2 mM Glutamax-ITM aufgenommen.

Die nichtadhärenenten Zellen wurden im Volumenverhältnis 1:1 mit AET-behandelten Schafserythrocyten gemischt, abzentrifugiert und in einem Volumen von 20 ml resuspendiert. Diese Suspension wurde erneut durch Zentrifugation über einer isotonen Biocoll-Lösung aufgetrennt, wobei die T-Zellen mit den gebundenen Erythrocyten sedimentiert wurden. Die Schafserythrocyten wurden in $1 \times$ ACK (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA) hypoton lysiert.

Abschließend wurden die T-Lymphocyten erneut gewaschen und auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die T-Lymphocyten wurden über Nacht mit $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ des Lectins Phytohemagglutinin (PHA; Sigma) stimuliert, anschließend zweimal gewaschen und in RPMI / 10% FCS / 2 mM Glutamax-ITM in der Anwesenheit von 25 U/ml IL-2 weiterkultiviert.

2.iii. TCR-Stimulation von T-Lymphocyten

Um eine Stimulation des T-Zell-Rezeptors zu erzeugen oder zu simulieren, wurden drei unterschiedliche Methoden angewendet.

1. Ein agonistischer, monoklonaler Antikörper gegen die CD3-Komponente des TCR-Signalkomplexes (OKT3) (Kung *et al.*, 1979) wurde in PBS auf eine Konzentration von 10 – 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt. Der Boden einer Zellkulturschale oder -flasche wurde mit dieser Lösung bedeckt. Nach Übernacht-Inkubation bei 37 °C wurde mehrfach mit PBS gewaschen, und die Zellen wurden in das beschichtete Gefäß gegeben.

2. Das Lectin Phytohemagglutinin bindet bestimmte Glykosylierungsmuster an Oberflächenproteinen von T-Lymphocyten. Vermutlich durch Bindung und Oligomerisierung des TCR/CD3-Komplexes werden T-Lymphocyten durch PHA antigenunabhängig stimuliert. PHA wurde in einer Konzentration von 2 µg/ml verwendet.

3. Die Stimulation des TCR wird häufig pharmakologisch imitiert: der Phorbol-ester Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) führt zu starker Aktivierung des TCR-Effektors Proteinkinase C (PKC), während die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Zugabe des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin simuliert wird. Zur Stimulation von T-Lymphocyten wurden 100 ng/ml PMA und 1 µM Ionomycin verwendet.

2.iv. Analyse von apoptotischem Zelltod mittels Durchflusscytometrie

Die Unterscheidung lebender und toter Lymphocyten anhand ihrer Streuparameter im Durchflusscytometer wurde beschrieben (Mentz *et al.*, 1998). Um Kulturen auf eventuell durch die Stimulationsbedingungen eintretenden Zelltod zu untersuchen, wurden Aliquots von 100 µl entnommen und mit 100 µl Propidiumiodid-Färbepuffer (5 µg/ml Propidiumiodid in PBS) versetzt. Im Durchflusscytometer wurden lebende und tote Zellen anhand ihrer Streuparameter (lebende Zellen: FSC hoch, SSC niedrig; tote Zellen: FSC niedriger, SSC erhöht) und der Aufnahme von Propidiumiodid durch tote Zellen identifiziert.

2.v. Transfektion

Jurkat T-Lymphocyten wurden durch Elektroporation transfiziert. Hierzu wurden die Zellen abzentrifugiert und in RPMI / 10% FCS / 2 mM Glutamax-ITM bei einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml resuspendiert. 400 µl dieser Suspension wurden mit 5 µg Plasmid-DNA versetzt. Die Transfektion erfolgte in einem GenePulser II (Biorad) in Elektroporationsküvetten mit einem Spaltmaß von 0,4 cm. Es wurde ein Puls von 250 V bei einer Kapazität von 960 µF appliziert.

Anschließend wurden die Zellen bei ca. 5×10^5 Zellen/ml in RPMI / 10% FCS / 2 mM Glutamax-ITM / 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin weiterkultiviert.

2.vi. Luciferase-Reporterexpressionsexperiment

Jurkat T-Lymphocyten wurden mit Reporterkonstrukten transfiziert und über Nacht weiterkultiviert. Die Expression des Reporters wurde durch Stimulation mit PMA (100 ng/ml, Merck) und Ionomycin (1 µM, Merck) für 14-18 h induziert.

Nach der Stimulation wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in 50 µl 1× Passive Lysis Buffer (Promega) bei Raumtemperatur für 20 min zentrifugiert. Nach Abzentrifugation von Zelltrümmern wurden zwei 15 µl-Aliquots des Lysats in einem Luminometer (DuoLumat, Berthold) nach Zugabe von 50 µl Luciferase-Reagenz (s. o.) vermessen. Das durch Messung eines leeren Probenröhrchens ermittelte Hintergrundsignal wurde von den experimentellen Messwerten abgezogen, bevor Mittelwert und Standardabweichung aus den üblicherweise in Triplikaten durchgeführten Messungen ermittelt wurden.

Um Transfektionseffizienz und Induktion von Apoptose im Verlauf des Experiments zu überwachen, wurden die Jurkat T-Lymphocyten regelmäßig mit 0,5 µg des Expressionsvektors pEGFP-N1 cotransfiziert. Vor der Ernte der Zellen wurde in kleinen Aliquots der individuellen Kulturen die Transfektionsrate und der Anteil toter Zellen durchflusscytometrisch überprüft. In keinem der hier gezeigten Experimente wurde behandlungsabhängige Toxizität oder schwankende Transfektionseffizienz detektiert.

2.vii. Western Blot

Etwa 2×10^6 Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in 100 µl Triton X-100-Lysepuffer resuspendiert. Nach 20 min auf Eis wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt. Die Proteinkonzentration des Überstands wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Pierce) bestimmt.

15-40 µg zellulärer Proteine wurden durch Kochen (5 min, 95 °C) in reduzierendem Ladepuffer (240 mM Tris, pH 6,8; 6% SDS; 30% Glycerol; 25% β-Mercaptoethanol) denaturiert und durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Die separierten Proteine wurden durch Semidry-Blot auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden durch Inkubation in PBS mit 0,05% Tween-20 und 5% (w/v) Magermilchpulver für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Primärantikörper wurden wie folgt eingesetzt: anti-c-FLIP NF6, 1:10 in PBS / 0,05% Tween-20; anti-α-Tubulin, 1:8000 in PBS / 0,05% Tween-20. Zur Detektion der Primärantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper (goat anti-mouse HRP, Sigma) in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS / 0,05% Tween-20 / 1% Magermilchpulver eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz (Renaissance Enhanced Chemiluminescence, NEN).

2.viii. RNA-Isolation und RT-PCR

Zum semiquantitativen Nachweis von Transkripten wurden $2-5 \times 10^6$ Jurkat oder primäre humane T-Lymphocyten in 1 ml TRIZOL-Reagenz (Invitrogen) bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Lysat kurz gemischt und zentrifugiert (5 min, 10000 g, 4 °C). Aus der oberen, wässrigen Phase wurde die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol ausgefällt und abzentrifugiert (30 min, 10000 g, 4 °C). Nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde die RNA vorsichtig getrocknet und in 30-50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Nach photometrischer Bestimmung der Konzentration wurden 2 µg der RNA für die Reverse Transkription vorbereitet: Hierzu wurden Puffer und Reagenzien aus dem RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems) verwendet:

2 µg	RNA
8 µl	25 mM MgCl ₂
4 µl	10× PCR-Puffer II
4 µl	dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
2 µl	100 mM Oligo-(dT) ₁₆
2 µl	RNase-Inhibitor
2 µl	MuLV Reverse Transkriptase
auf 40 µl	mit RNase-freiem Wasser auffüllen

Die Proben wurden in einem Thermocycler (DNA Engine Dyad, MJ Research / Biorad) bei folgenden Temperaturen inkubiert:

15 min	25 °C
45 min	42 °C
5 min	95 °C

Die so erhaltene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt. Für PCR-Reaktionen wurden 5 µl der cDNA in einer 50 µl-Reaktion eingesetzt:

5 µl	cDNA
5 µl	<i>Taq</i> -Reaktionspuffer
je 1 µl	10 mM Oligonukleotid-Primer
1 µl	dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,5 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
36,5 µl	Wasser

Die Reaktionsbedingungen für transkriptspezifische Primer wurden separat optimiert. Als Kontrolle für gleichmäßigen cDNA-Einsatz und gleich bleibende RNA-Qualität wurde die mRNA des konstitutiv exprimierten Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (G3PDH) analysiert. Reaktionsprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.ix. Molekularbiologie

Die Klonierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Amplifikation der Plasmide wurde *Escherichia coli*, Stamm XL10-Gold (Stratagene) verwendet. Alle Restriktionsenzyme wurden von Fermentas bezogen.

2.ix.1. TRANSFORMATION UND KRYOKONSERVIERUNG VON BAKTERIEN

E. coli XL10-Gold wurden in 500 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und durch Zentrifugation geerntet. Nach Abnehmen des Mediums wurden die Bakterien in 37,5 ml TSB (10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 5% DMSO, 10% Glycerol, 1× LB) resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 100 µl-Aliquots dieser kompetenten Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 100 ng DNA oder eine Ligationssreaktion mit 20 µl 5× KCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂) versetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Diese Mischung wurde zu einem Aliquot auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien gegeben. Nach zwanzigminütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum (i. d. R. 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert.

Zur Kryokonservierung wurden Einzelkolonien von frischen LB-Agarplatten in LB-Medium mit Selektionsantibiotikum inokuliert und über Nacht bei 37 °C angezogen. Nach Zugabe von 15% Glycerol wurden Aliquots bei -80 °C eingefroren. Aus den Kryokonserven wurden bei Bedarf Flüssigkulturen durch Überführen eines Stückes der gefrorenen Konserve angeimpft.

2.ix.2. PLASMID-ISOLATION

Plasmide wurden durch alkalische Lyse und anschließende Säulenauftrennung aus Übernachtskulturen in LB mit Selektionsantibiotikum aufgereinigt. Hierzu wurden folgende Kits verwendet: Qiagen Plasmid Mini für Aufreinigungen im kleinen Maßstab („Miniprep“) bei der Identifikation positiver Klone, Macherey & Nagel Nucleobond 500 AX für Aufreinigungen im großen Maßstab („Maxiprep“), um ausreichende DNA-Mengen für Transfektionsexperimente zu erhalten. Die Aufreinigung erfolgte entlang der Gebrauchsanleitung des jeweiligen Herstellers.

2.ix.3. ISOLATION GENOMISCHER DNA

Zur Klonierung potenzieller Promoter-Regionen wurde genomische DNA aus heparinisiertem Vollblut gesunder freiwilliger Spender isoliert. Hierzu wurde 1 ml Vollblut mit 800 µl 1× SSC versetzt und durch Zentrifugation (1 min, 10000 g, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 1 ml 1× SSC ersetzt. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 10000 g, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 375 µl 0,2 M Natriumacetatlösung resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl 10% SDS und 10 µl Proteinase K-Stammlösung (10 µg/µl in TE) wurden die Leukocyten bei 55 °C für 1 Stunde lysiert.

Nach der Lyse wurde 1 ml einer puffergesättigten Phenol- / Chloroform- / Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) zugegeben, gevortext und zentrifugiert (5 min, 10000 g, 4 °C). Die DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 1 ml kaltem Ethanol präzipitiert (-20 °C, 1 h) und durch Zentrifugation sedimentiert (30 min, 10000 g, 4 °C). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und bei -20 °C unter 70% Ethanol bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Vor Verwendung wurde das Ethanol entfernt, das DNA-Pellet vollständig getrocknet und in 50-100 µl 10 mM Tris, pH 7,5 aufgenommen. Ein Aliquot genomischer DNA wurde nie häufiger als zweimal eingefroren und wieder aufgetaut.

2.ix.4. KLONIERUNG VON REPORTER-KONSTRUKTEN

Um die Regulation der Expression von c-FLIP zu analysieren, wurden im genomischen Bereich 5' des ersten codierenden Exons des *cflar*-Gens durch Homologiesuche gegen die Datenbank TRANSFAC® zwei potenzielle Promoter-Regionen identifiziert.

Die erste Kandidatenregion (pFLIP(1), 1574 bp) umfasst die Nukleotide 201804895 – 201806468 auf Chromosom 2 (Ensembl-Datenbank, Version 32.35e). Sie wurde aus genomischer DNA durch PCR amplifiziert und durch TA-Ligation in den Klonierungsvektor pCR2.1 inseriert. Aus diesem Intermediärklon wurde die Zielsequenz durch Restriktion mit den Enzymen *Kpn*I und *Bgl*II freigesetzt und in den entsprechend geschnittenen Reportervektor pGL3 subkloniert (**Abb. 13**). Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung auf die korrekte Orientierung des Inserts und Korrektheit der Sequenz überprüft.

Die zweite Kandidatenregion (pFLIP(2), 953 bp) umfasst die Nukleotide 201816428 – 201817380 auf Chromosom 2 (Ensembl-Datenbank, Version 32.35e). Sie wurde aus genomischer DNA durch PCR amplifiziert und durch TA-Ligation in den Klonierungsvektor pCR2.1 inseriert. Aus diesem Intermediärklon wurde die Zielsequenz durch Restriktion mit den Enzymen *Xho*I und *Bgl*II freigesetzt und in den entsprechend geschnittenen Reportervektor pGL3 subkloniert (**Abb. 13**). Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung auf die korrekte Orientierung des Inserts und Korrektheit der Sequenz überprüft.

Zur Inaktivierung der NF- κ B-Bindesequenz in pFLIP(2) wurden Punktmutationen durch PCR eingeführt. Hierzu wurden mit den in Tab. 1 angegebenen Oligonukleotiden sowie den initial zur Klonierung verwendeten Primern aus pGL3·pFLIP(2) zwei überlappende DNA-Fragmente erzeugt, die anschließend durch PCR mit den Klonierungsprimern zusammengefügt und wie oben beschrieben über den Intermediärvektor pCR2.1 in den Reportervektor pGL3 kloniert wurden. Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung auf die korrekte Orientierung des Inserts und Korrektheit der Sequenz überprüft.

Zur Inaktivierung der NF-AT-Bindesequenz in pFLIP(2) wurden Punktmutationen durch PCR eingeführt. Hierzu wurde mit den in Tab. 1 angegebenen Oligonukleotiden ein DNA-Fragment erzeugt, das durch TA-Ligation in pCR2.1 subkloniert wurde. Aus diesem Intermediärklon wurde die mutierte Zielsequenz durch Restriktion mit den Enzymen *Pfu*MI und *Bgl*II freigesetzt und in den analog geschnittenen Zielvektor pGL3·pFLIP(2) inseriert. Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung auf die korrekte Orientierung des Inserts und Korrektheit der Sequenz überprüft.

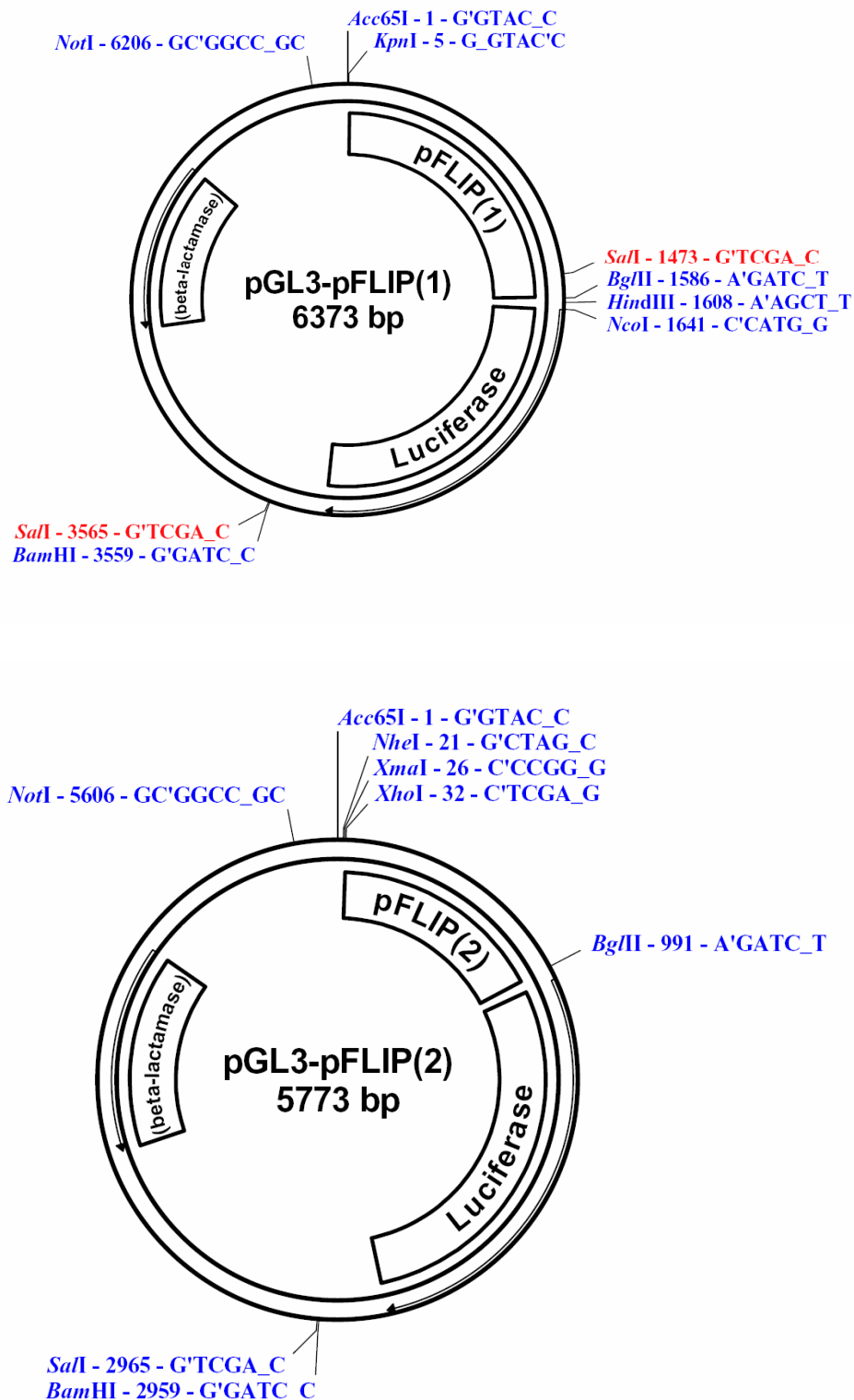


Abbildung 13. Reporterexpressionskonstrukte zur Analyse der c-FLIP-Promotoren

Restriktionskarten der Luciferasereporterexpressionsvektoren pGL3-pFLIP(1) und pGL3-pFLIP(2). Wichtige Restriktionsschnittstellen sowie die offenen Leserahmen für die bakterielle β -Lactamase und das Luciferase-Protein sind eingezeichnet.

2.ix.5. GENERIERUNG VON DELETIONSMUTANTEN MIT EXONUCLEASE SI

Zur Identifikation einer minimalen Promoter-Region wurden vom 5'-Ende her serielle Deletionsmutanten von pFLIP(2) unter Verwendung eines Exonuclease III / S1-Nuclease-Kits (Fermentas) erzeugt. Hierzu wurde pGL3-pFLIP(2) durch Verdau mit *NheI* linearisiert. Die überhängenden 3'-Enden der Schnittstellen wurden durch Klenow-Polymerase mit α -S-Nucleotiden aufgefüllt und so vor der Aktivität von Exonucleasen geschützt. Anschließend wurde das 5'-Ende des pFLIP(2)-Inserts durch Verdau mit *XhoI* freigelegt.

Die DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und mit Exonuclease III bei 25 °C verdaut. In halbminütigen Abständen wurden der Reaktion Proben entnommen. In diesen wurden die einzelsträngigen Bereiche, die durch Exonuclease III erzeugt werden, durch S1-Nuclease abgebaut (30 min, RT). Abschließend wurden die trunkierten Konstrukte religiert und in *E. coli* transformiert. Mutanten wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung identifiziert.

Ergebnisse

c-FLIP scheint eine der wichtigsten Determinanten der zeitweiligen Resistenz primärer humaner T-Lymphocyten gegen Todesrezeptor-vermittelte Apoptose darzustellen. Obwohl eine Studie in murinen T-Lymphocyten auf eine IL-2-abhängige Reduktion der zellulären c-FLIP-Expression hindeutet, kann dies in humanen Lymphocyten nicht beobachtet werden. Hingegen existieren für humane T-Lymphocyten Daten, die auf eine TCR-abhängige Induktion der Expression von c-FLIP hindeuten. Die Signalwege, von denen diese Induktion abhängt, sollten im Folgenden analysiert werden.

1. Analyse der Expression von c-FLIP in primären T-Lymphocyten

Um die Regulation der c-FLIP-Expression zu analysieren, wurde in primären humanen T-Lymphocyten gearbeitet. Diese wurden nach polyklonaler Stimulation durch das Lectin Phytohemagglutinin für 5 Tage in der Gegenwart des Cytokins und T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-2 kultiviert. Während dieser Kulturperiode erlangen die T-Zellen einen Phänotyp der AICD-Sensitivität, leiten also nach Restimulation des T-Zell-Rezeptors durch monoklonale Antikörper auto- und parakrin CD95-abhängige Apoptose ein. Ein hoher Prozentsatz der T-Lymphocyten überlebt allerdings diese Apoptose-Induktion, vermutlich wegen erhöhter Expression des antiapoptotischen Effektors c-FLIP.

1.i. Expression von c-FLIP wird durch TCR-Stimulation induziert

1.i.1. STIMULATION DES T-ZELL-REZEPTORS FÜHRT ZU INDUKTION MEHRERER C-FLIP-SPLICEVARIANTEN

Werden voraktivierte primäre humane T-Zellen über ihren Antigenrezeptor stimuliert, so beobachtet man im Western Blot eine Induktion von c-FLIP_s (**Abb. 14**). Diese Induktion wird verstärkt bei Costimulation mittels agonistischer Antikörper gegen den Corezeptor CD28 (**Abb. 14**). Gleichzeitig beobachtet man die proteolytische Spaltung von c-FLIP_L in das DED-enhaltende p43-Fragment. Diese Prozessierung ist auf die Induktion von AICD und die damit verbundene Aktivität von Initiator- und Effektorcaspasen zurückzuführen und erlaubt es nicht, deutliche Aussagen über die Stimulationsabhängigkeit der zellulären c-FLIP_L-Expression zu treffen.

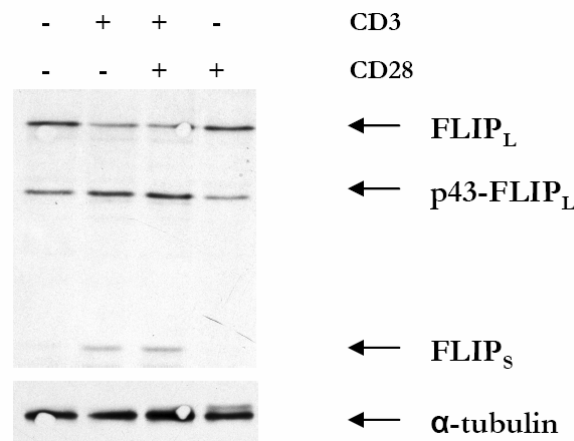


Abbildung 14. TCR-Stimulation induziert c-FLIP

Voraktivierte primäre humane T-Lymphocyten wurden nach 6 Tagen Kultur mit agonistischen monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 stimuliert. Expression von c-FLIP wurde durch Western Blot analysiert.

Um die Expression von c-FLIP_L besser beurteilen zu können, wurde die Restimulation primärer humaner T-Lymphocyten in Anwesenheit des Caspaseninhibitors zVAD-fmk wiederholt. Dieser bindet kovalent an das aktive Zentrum von Caspasen und inhibiert deren Aktivität. Neben der Restimulation mit agonistischen monoklonalen Antikörpern gegen CD3 wurden die T-Lymphocyten mit dem Phorbolster PMA und dem Ca²⁺-Ionophor Ionomycin stimuliert. Die Stimulation mit diesen beiden Substanzen, die vor allem PKC-abhängige (PMA) und Ca²⁺-abhängige (Ionomycin) Signaltransduktionsketten beeinflussen, wird häufig eingesetzt, um ein TCR-Signal pharmakologisch zu imitieren.

Wie in **Abb. 15** zu erkennen ist, führt die Restimulation primärer humaner T-Lymphocyten mit monoklonalen anti-CD3-Antikörpern oder mit PMA und Ionomycin zur Induktion von c-FLIP_S und c-FLIP_R, parallel beobachtet man proteolytische Prozessierung von c-FLIP_L. Inhibiert man diese durch Zugabe von zVAD-fmk, so erkennt man, dass die Gesamtmenge an c-FLIP_L deutlich zunimmt. Diese Coregulation von c-FLIP_L und c-FLIP_S deutet auf einen Regulationsmechanismus hin, der beide Proteinvarianten gleichermaßen betrifft. Eine von c-FLIP_L unabhängige Regulation von c-FLIP_S kann nicht bestätigt werden (Kirchhoff *et al.*, 2000b). Diese Vermutung hatte sich aus der Beobachtung hergeleitet, dass die Signale für c-FLIP_L und p43-c-FLIP_L in ihrer Summe das c-FLIP_L-Signal in nicht stimulierten Zellen nicht überschreiten; mögliche Ursachen hierfür wären ein beschleunigter Abbau von p43-c-FLIP_L oder eine verringerte Affinität des verwendeten Antikörpers für das p43-Spaltprodukt.

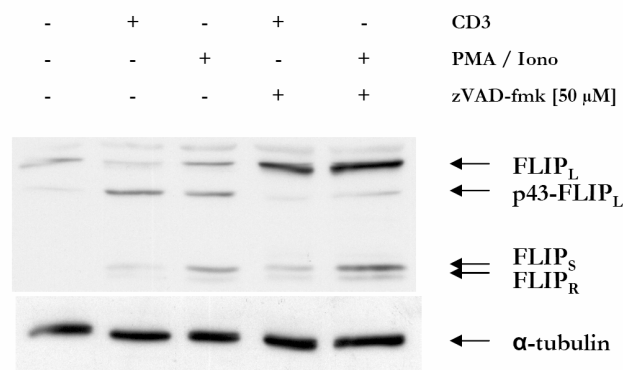


Abbildung 15. TCR-Stimulation induziert Expression aller Splicevarianten von c-FLIP

Restimulation voraktivierter primärer humaner T-Lymphocyten mit agonistischen monoklonalen Antikörpern gegen CD3 oder PMA und Ionomycin in Gegenwart des Caspaseninhibitors zVAD-fmk. Expression von c-FLIP wurde mittels Western Blot analysiert.

1.i.2. INHIBITION VERSCHIEDENER SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE VERHINDERT DIE INDUKTION VON C-FLIP

Um die Mechanismen hinter der Induktion von c-FLIP bei der Restimulation primärer humaner T-Lymphocyten besser zu verstehen, wurden niedermolekulare Inhibitoren verschiedener Moleküle eingesetzt, die an der T-Zell-Rezeptor-abhängigen Signaltransduktion beteiligt sind. In **Abb. 16** ist gezeigt, dass die Inhibition der Serin-/Threonin-Proteinkinase MEK1, die ein wichtiger Aktivator der Mitogen-Aktivierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2 ist, durch die Substanz PD 98059 zu einer dosisabhängigen Verringerung der TCR-abhängigen c-FLIP-

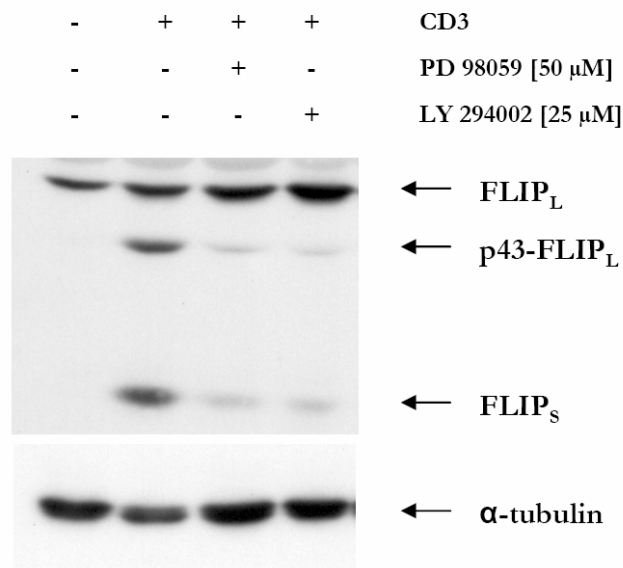


Abbildung 16. Inhibition von ERK und PI3K inhibiert die Induktion von c-FLIP

Primäre humane T-Lymphocyten wurden voraktiviert und nach 6 Tagen mit agonistischen monoklonalen Antikörpern gegen CD3 restimuliert. Inhibitoren von MEK1 (PD 98059) und PI3K (LY 294002) wurden während der Stimulation zugegeben und Expression von c-FLIP wurde mittels Western Blot analysiert.

Induktion führt. Einen ähnlichen Effekt hat die Inhibition von PI3K, einer Lipidkinase, die zur Aktivierung des Signalmoleküls Akt / Proteinkinase B beiträgt, durch LY 294002. Um die Möglichkeit unspezifischer Effekte dieser Substanzen auszuschließen, wurden diese Experimente unter Verwendung der alternativen Inhibitoren U 0126 (MEK1) und Wortmannin (PI3K) mit identischen Ergebnissen wiederholt (Daten nicht gezeigt).

Die Stimulation des T-Zell-Rezeptors führt zur intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus Speicherorganellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), gefolgt von massivem Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Medium. Die resultierende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Phosphatase Calcineurin, die in der TCR-Signaltransduktion eine zentrale Rolle einnimmt. Inhibition dieser Phosphatase durch Cyclosporin A oder FK 506 / Rapamycin verhindert die Induktion von c-FLIP-Expression in restimulierten primären humanen T-Lymphocyten (**Abb. 17**).

In den bisher gezeigten Experimenten wurde demonstriert, dass die Restimulation voraktivierter primärer humaner T-Lymphocyten zu einer deutlichen Induktion der Expression aller endogen exprimierten c-FLIP-Isoformen führt. Diese Induktion ist abhängig von der Aktivität der TCR-abhängigen Signaltransduktionsmodule MEK/ERK, PI3K/Akt und Ca^{2+} /Calcineurin.

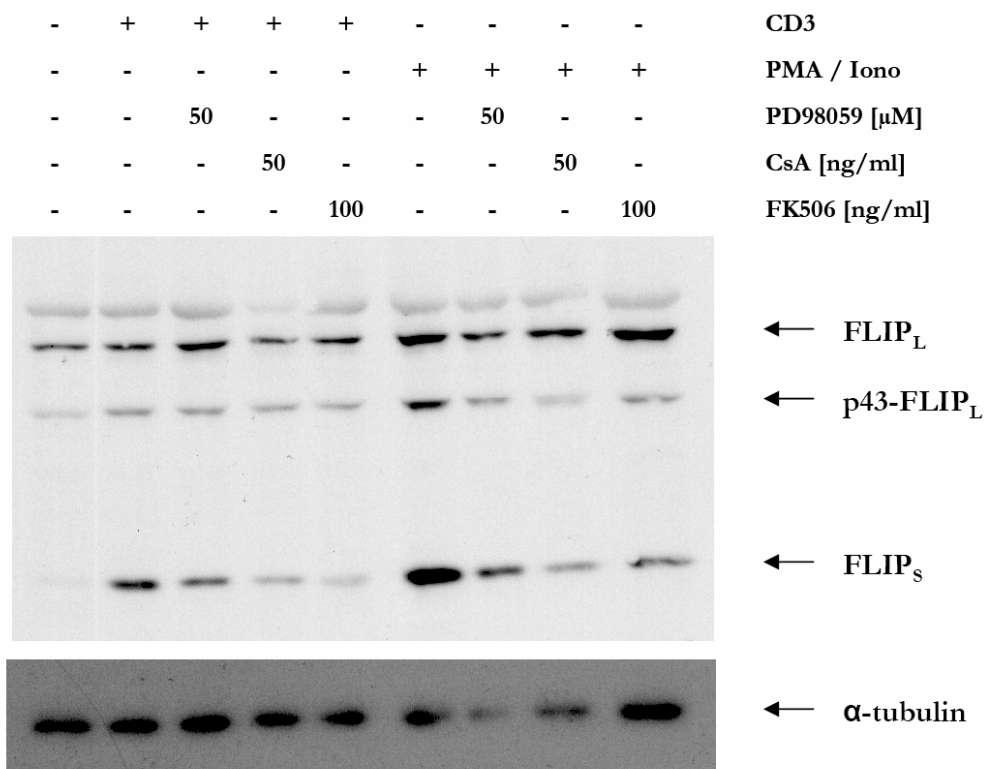


Abbildung 17. Inhibition von Calcineurin verhindert die Induktion von c-FLIP

Primäre humane T-Lymphocyten wurden voraktiviert und nach 6 Tagen mit agonistischen monoklonalen Antikörpern gegen CD3 oder PMA und Ionomycin restimuliert. Inhibitoren von MEK1 (PD 98059) oder Calcineurin (CsA und FK506) wurden während der Stimulation zugegeben und Expression von c-FLIP wurde mittels Western Blot analysiert.

Bisher wurde die c-FLIP-Expression in voraktivierten T-Lymphocyten untersucht, also in einer Situation, in der Stimulation des TCR zu *de novo*-Expression von CD95L und Einleitung von AICD führen kann. Im Gegensatz dazu verursacht TCR-Ligation in naiven, ruhenden T-Lymphocyten keine Apoptose. Um die Frage zu beantworten, ob die Induktion von c-FLIP allein in der Apoptose-sensitiven Situation der TCR-Restimulation auftritt oder als situationsunabhängige Antwort auf TCR-Ligation angesehen werden kann, wurde die Expression von c-FLIP vor und nach der primären Über-Nacht-Stimulation primärer humaner T-Lymphocyten mit dem Lectin PHA mittels Western Blot untersucht (**Abb. 18**). Man erkennt, dass die Expression von c-FLIP auch in diesem Szenario deutlich induziert wird.

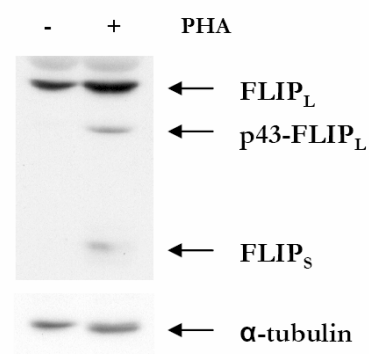


Abbildung 18. Induktion von c-FLIP bei primärer T-Zell-Stimulation

Primäre humane T-Lymphocyten wurden nach der Isolation mit dem Lectin PHA stimuliert. Expression von c-FLIP wurde mittels Western Blot analysiert.

Dieses Ergebnis kann als Indiz dafür betrachtet werden, dass die Induktion von c-FLIP nicht auf die TCR-Restimulation bereits aktivierter T-Lymphocyten beschränkt ist. Vielmehr scheint es sich um eine generelle Antwort auf TCR-Stimulation zu handeln, die ebenfalls bei der primären Stimulation naiver T-Lymphocyten auftaucht.

1.ii. Die Induktion von c-FLIP ist transkriptionell reguliert

Die beobachtete Akkumulation von c-FLIP-Proteinen kann entweder transkriptionell verursacht werden oder posttranskriptionell durch Stabilisierung von Protein oder mRNA.

Um die Möglichkeit einer posttranslationalen Stabilisierung des Proteins beurteilen zu können, wurden primäre humane T-Lymphocyten über Nacht mit monoklonalen Antikörpern restimuliert. Nach 16 Stunden wurde den Kulturen Cycloheximid zugesetzt. Cycloheximid inhibiert die eukaryotische Translation durch Inhibition von Initiations- und Elongationsschritten am Ribosom (Obrig *et al.*, 1971). c-FLIP wird in der Gegenwart von Cycloheximid innerhalb

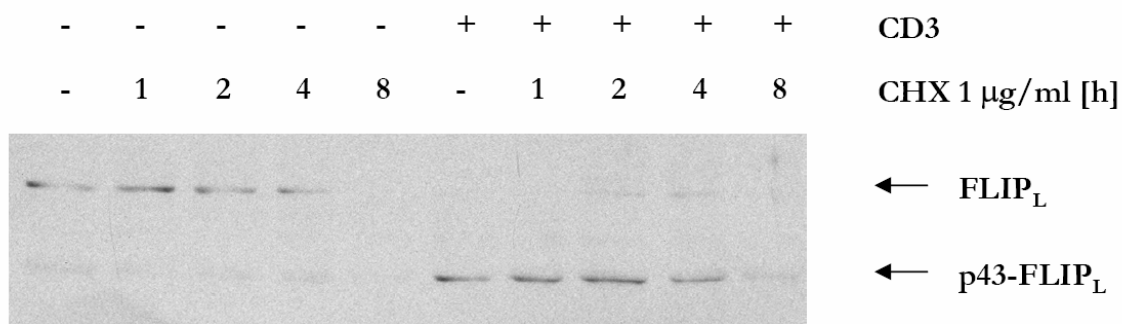


Abbildung 19. Die Abbaugeschwindigkeit von c-FLIP wird durch TCR-Stimulation nicht verändert

Voraktivierte primäre humane T-Lymphocyten wurden über Nacht mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 stimuliert. Nach 16 Stunden wurde den stimulierten Kulturen und unstimulierten Kontrollkulturen über einen Zeitraum von 8 Stunden Cycloheximid zugesetzt. Expression von c-FLIP wurde mittels Western Blot analysiert.

weniger Stunden vermutlich proteasomal abgebaut (Fulda *et al.*, 2000; Ganten *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2004); die Geschwindigkeit dieses Abbaus sollte Rückschlüsse auf die Stabilität des Proteins erlauben. In **Abb. 19** erkennt man, dass die Geschwindigkeit des c-FLIP-Abbaus in restimulierten T-Lymphocyten der Geschwindigkeit entspricht, mit der das Protein in nicht restimulierten T-Lymphocyten abgebaut wird. Eine Stabilisierung des Proteins kann somit ausgeschlossen werden. Die beobachtete Induktion von c-FLIP könnte also durch eine Akkumulation der entsprechenden mRNAs verursacht werden. Alternativ dazu wäre eine effizientere Translation der mRNAs denkbar, die in (Audic und Hartley, 2004) als möglicher posttranskriptioneller Regulationsmechanismus diskutiert wird. In **Abb. 20** wurde mittels RT-PCR gezeigt, dass in

restimulierten primären humanen T-Lymphocyten die mRNAs für c-FLIP_L und c-FLIP_S induziert werden. Diese Induktion ist in der Größenordnung mit der Akkumulation von c-FLIP-Proteinen vergleichbar, impliziert also eine Regulation der c-FLIP-Expression auf transkriptionellem Niveau. Einflüsse auf die Translationseffizienz einzelner mRNAs werden im Folgenden daher nicht weiter untersucht.

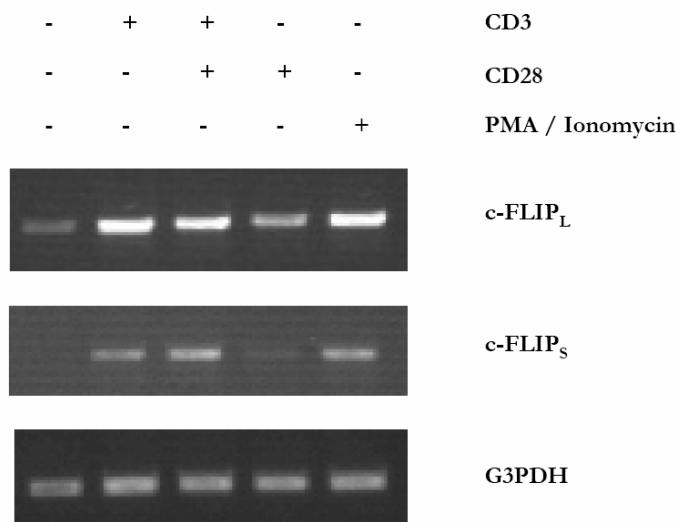


Abbildung 20. Transkriptionelle Induktion von c-FLIP

Voraktivierte primäre humane T-Lymphocyten wurden über Nacht mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 oder mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die Expression von c-FLIP-mRNAs wurde durch RT-PCR analysiert.

Actinomycin D ist ein Inhibitor von RNA-Polymerase II (Wadkins *et al.*, 1996). Wird die Neusynthese von mRNAs durch Applikation von Actinomycin D unterbunden, kann man aus der Abbaugeschwindigkeit einer mRNA auf ihre Stabilität rückschliessen. Analog zu Abb. 19 wurden voraktivierte humane T-Lymphocyten mit monoklonalen Antikörpern restimuliert. Nach ca. 16 h wurden die Zellen mit Actinomycin D behandelt, und der Abbau von c-FLIP mRNAs wurde mittels RT-PCR verfolgt. Wie man in **Abb. 21** erkennen kann, wird die Abbaugeschwindigkeit von c-FLIP mRNAs in primären humanen T-Lymphocyten durch Restimulation nicht verändert; man kann also auch eine Stabilisierung der mRNA als Ursache für die beobachtete Induktion der Proteinexpression ausschließen.

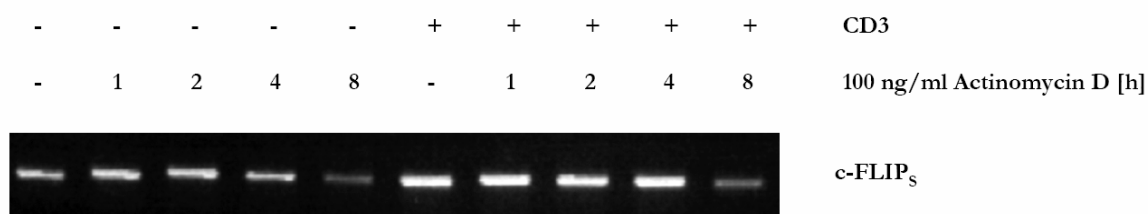


Abbildung 21. Die Abbaugeschwindigkeit von c-FLIP mRNA wird nicht verändert

Voraktivierte primäre humane T-Lymphocyten wurden über Nacht mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 restimuliert und anschließend für bis zu 8 Stunden mit Actinomycin D behandelt. Der Abbau der mRNA für c-FLIP_S wurde mittels RT-PCR verfolgt. Um die Abbaukinetik zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen vergleichen zu können, wurde die in der PCR eingesetzte cDNA-Menge so angepasst, dass die Intensität des Ausgangssignals in unstimulierten und stimulierten Zellen vergleichbar war.

Diese Experimente demonstrieren, dass die TCR-abhängige Induktion der c-FLIP-Expression ein transkriptionelles Ereignis ist. Um die Natur dieser transkriptionellen Regulation besser untersuchen zu können, soll die Identität der regulierten mRNAs im Folgenden genauer analysiert werden.

1.iii. TCR-Stimulation induziert die Expression von c-FLIP mRNAs mit unterschiedlichen 5'-untranslatierten Regionen

Vom *cflar*-Gen werden mindestens 14 unterschiedliche mRNAs erzeugt (Djerbi *et al.*, 2001). Allerdings sind bisher nur drei Varianten von c-FLIP bekannt, die endogen als Protein exprimiert werden: c-FLIP_L, c-FLIP_S und c-FLIP_R (Golks *et al.*, 2005). Bei näherer Betrachtung der publizierten Splicevarianten fällt auf, dass sowohl c-FLIP_L als auch c-FLIP_S von zwei unterschiedlichen mRNAs codiert werden, die in ihrer 5'-untranslatierten Region (5'-UTR)

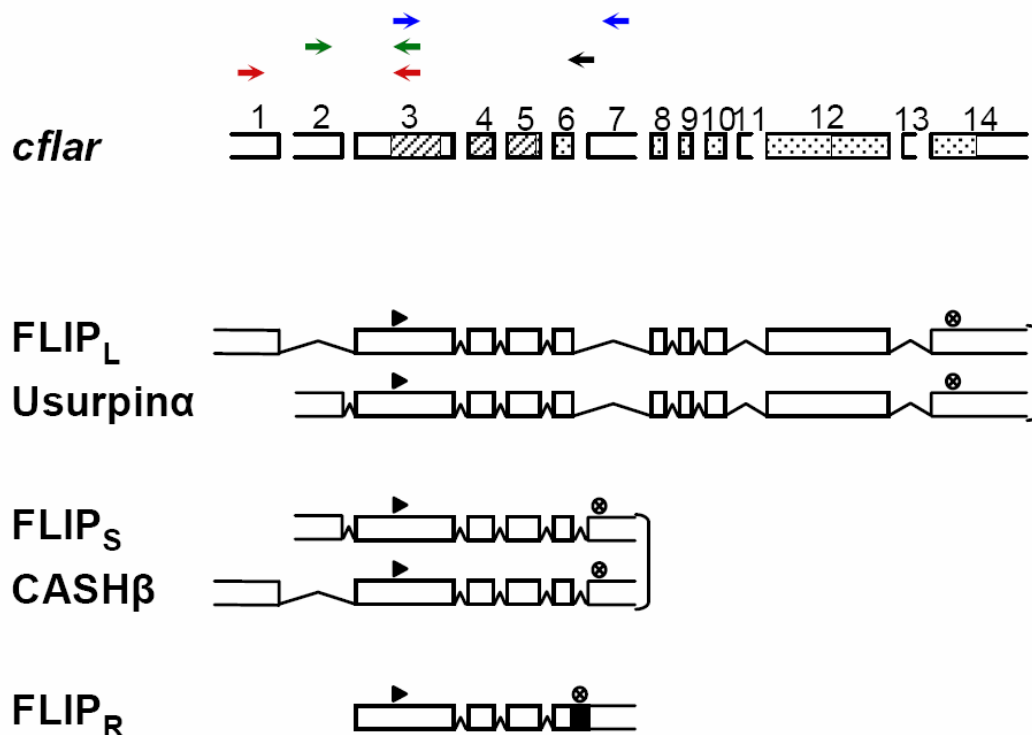


Abbildung 22. Transkriptstrukturen und verwendete Primer

Schematische Darstellung der mRNAs, die für endogen exprimierte Varianten von c-FLIP codieren. Hybridisierungsregionen der für RT-PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer sind durch Pfeile angedeutet. Blaue Pfeile symbolisieren Primer für c-FLIP_S oder CASH-β mRNAs, grün angeordnete Primer detektieren Transkripte mit Exon 2 in ihrer 5'-UTR, rot eingezeichnete Primer amplifizieren Transkripte mit Exon 1 in ihrer 5'-UTR. Für FLIP_R-spezifische PCR wurde ein *reverse*-Primer (schwarz) eingesetzt, der im 3'-terminalen Bereich der codierenden Sequenz der c-FLIP_R-mRNA hybridisiert.

unterschiedliche Exons beinhalten. Die für c-FLIP_R publizierte mRNA-Sequenz beinhaltet nur den translatierten Bereich und weist keine 5'-UTR aus (**Abb. 22**) (Djerbi *et al.*, 2001).

Um zu klären, welche mRNA-Varianten bei der TCR-Stimulation in primären humanen T-Lymphocyten induziert werden, wurden die unterschiedlichen 5'-UTRs mittels RT-PCR nachgewiesen. Hierbei wurden Primer verwendet, die im ersten oder zweiten Exon des Transkripts hybridisieren. Als zweiter Primer wurde in beiden Reaktionen ein Oligonukleotid eingesetzt, das im dritten Exon bindet (schematisch dargestellt in **Abb. 22**).

In **Abb. 23** erkennt man, dass in ruhenden oder voraktivierten primären humanen T-Lymphocyten c-FLIP mRNAs vorliegen, die Exon 1 als ihre 5'-UTR enthalten. Bei TCR-Stimulation bleibt die Expression dieser mRNAs unverändert. Hingegen ist die Expression von

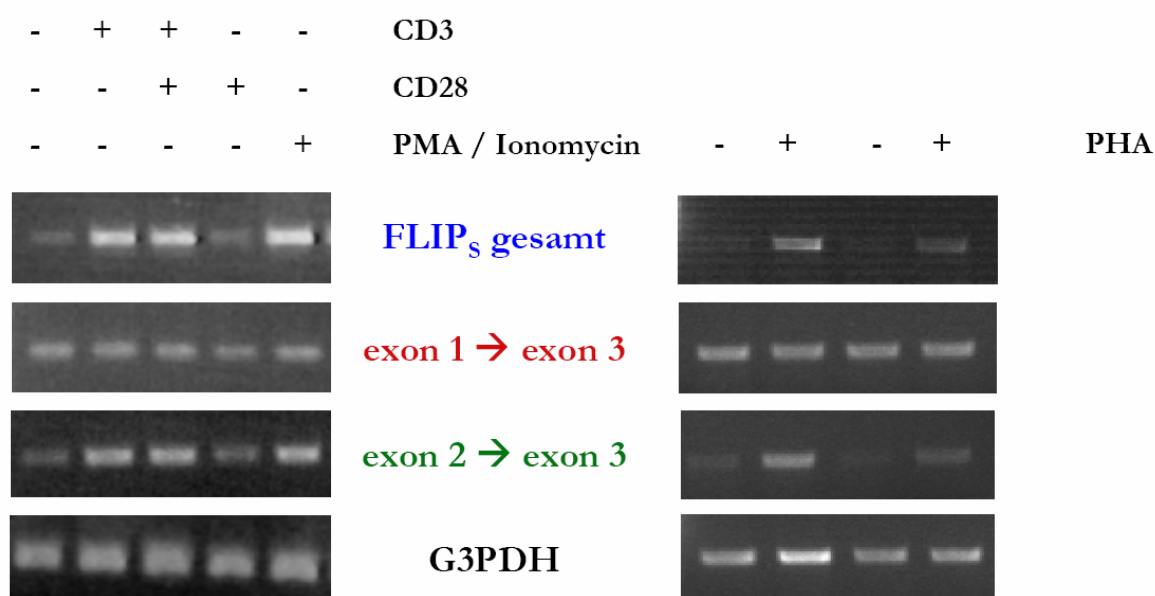


Abbildung 23. TCR-Stimulation induziert Expression von Exon 2 als 5'-UTR

Voraktivierte primäre humane T-Lymphocyten wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 oder mit PMA und Ionomycin restimuliert (links). Naive T-Lymphocyten wurden mit dem Lectin PHA stimuliert (rechts). Expression der 5'-untranslatierten Exons (vgl. Abb. 10) wurde mittels RT-PCR analysiert.

c-FLIP mRNAs, die Exon 2 als 5'-UTR enthalten, fast ausschließlich in stimulierten T-Lymphocyten zu erkennen. Diese Selektivität ist sowohl in der primären Stimulation naiver T-Lymphocyten als auch bei der TCR-Restimulation voraktivierter Zellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Die in **Abb. 23** dargestellten Ergebnisse erlauben die Aussage, dass TCR-Stimulation die Expression einer unterschiedlichen 5'-UTR in c-FLIP mRNAs induziert. Varianten dieser Art sind publiziert für c-FLIP_S und c-FLIP_L (vgl. **Abb. 22**).

Um festzustellen, ob möglicherweise ähnliche Effekte bei der Expression von c-FLIP_R beobachtet werden können, wurde RT-PCR mit Primern durchgeführt, die analoge, c-FLIP_R-spezifische Transkripte amplifizieren. Wie man in **Abb. 24** erkennt, gilt auch für c-FLIP_R dieselbe differentielle Regulation der 5'-UTR wie für die anderen exprimierten Varianten von c-FLIP. Die Identität der erhaltenen PCR-Produkte wurde durch Klonierung und Sequenzierung bestätigt.

Diese Experimente zeigen erstmalig, dass die Stimulation des T-Zell-Rezeptors zur Neoexpression von c-

FLIP-mRNAs führt, die Exon 2 des *cflar*-Gens als 5'-UTR enthalten. Diese transkriptionelle Induktion ist abhängig von MEK/ERK-, PI3K/Akt- und Ca²⁺/Calcineurin-vermittelter Signaltransduktion. Erstmalig wurde auch die Existenz zweier mRNAs nachgewiesen, die sich in gleicher Weise durch ihre 5'-UTR unterscheiden und die dritte endogen exprimierte Isoform von c-FLIP, c-FLIP_R exprimieren.

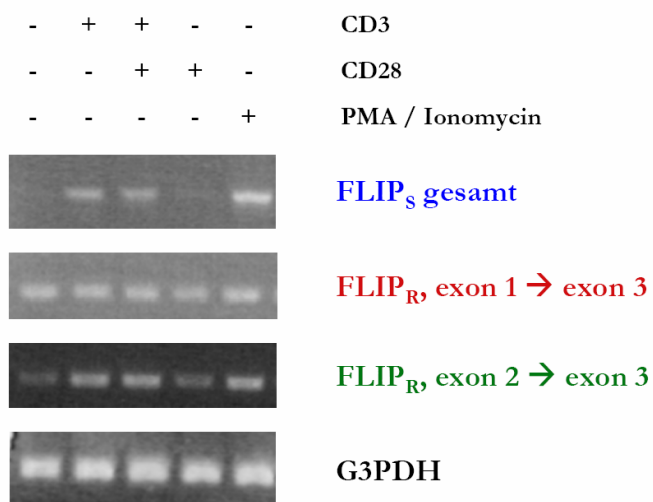


Abbildung 24. Zwei unterschiedliche Transkripte codieren c-FLIP_R

Zwei Transkripte mit unterschiedlicher 5'-UTR codieren c-FLIP_R. Primäre humane T-Lymphocyten wurden restimuliert, und c-FLIP_R-Transkripte wurden mittels RT-PCR nachgewiesen. Die Identität der Transkripte wurde durch Klonierung und Sequenzierung verifiziert.

1.iv. Zusammenfassung

In den bisher gezeigten Experimenten wurde bestätigt, dass die Expression von c-FLIP durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors induziert werden kann. Diese Induktion kann sowohl bei der primären Stimulation frisch isolierter, naiver humaner T-Lymphocyten als auch bei der Restimulation voraktivierter primärer humaner T-Lymphocyten beobachtet werden. Sie ist transkriptionell und hängt von MEK1, PI3K und Calcineurin ab. Von der TCR-abhängigen Induktion sind ausschließlich Transkripte betroffen, die Exon 2 als 5'-UTR enthalten; diese Transkripte wiederum liegen in ruhenden oder nicht restimulierten T-Lymphocyten nicht vor. Transkripte, die Exon 1 als 5'-UTR enthalten, liegen in primären humanen T-Lymphocyten unabhängig von deren Aktivierungszustand vor und werden durch TCR-Stimulation nicht nennenswert induziert. Dieser Regulationsmechanismus wurde in dieser Arbeit erstmals definiert und trifft auch für die dritte endogen exprimierte Variante von c-FLIP, c-FLIP_R, zu.

2. Analyse der Expression von c-FLIP in Jurkat T-Lymphocyten

Die bisher gezeigten Experimente zur Regulation von c-FLIP in primären humanen T-Lymphocyten beschränken sich auf Beobachtungen, die unter Einsatz von Signaltransduktionsinhibitoren gemacht wurden. Eine detailliertere Analyse dieser Regulation ist notwendig, aber in primären Zellen kaum durchführbar, da diese nur sehr schwer transfizierbar sind und selbst bei erfolgreicher Transfektion eine deutlich veränderte Reaktion auf Stimulation des T-Zell-Rezeptors zeigen (S. Fas, DKFZ Heidelberg, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund ist es unumgänglich, weiterführende Analysen in einer Zelllinie durchzuführen, die sich durch einfachere genetische Manipulierbarkeit auszeichnet und besser verfügbar ist als primäres Material. Zu diesem Zweck wurden weitere Experimente in der T-Lymphocyten-Zelllinie Jurkat (Klon J27) durchgeführt.

Im Folgenden soll überprüft werden, ob diese Zelllinie in ihrer Reaktion auf TCR-Stimulation mit primären humanen T-Lymphocyten vergleichbar ist. Dies ist insbesondere aufgrund der bekannten Unterschiede zwischen Jurkat und primären T-Lymphocyten von Bedeutung, die einige Aspekte der T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion betreffen (Abraham und Weiss, 2004). Aufgrund der niedrigeren Expression von CD3-Antigenen auf ihrer Oberfläche wurde für die Stimulation von Jurkat T-Lymphocyten ausschließlich der pharmakologische Stimulus durch PMA und Ionomycin eingesetzt.

2.i. Expression von c-FLIP in Jurkat wird induziert durch Stimulation mit PMA und Ionomycin

Werden Jurkat T-Lymphocyten durch PMA und Ionomycin stimuliert, kann man eine deutliche Akkumulation von c-FLIP-Proteinen beobachten (**Abb. 25**). Diese Akkumulation ist transient und erreicht ihr Maximum zu einem früheren Zeitpunkt als in primären humanen T-Lymphocyten.

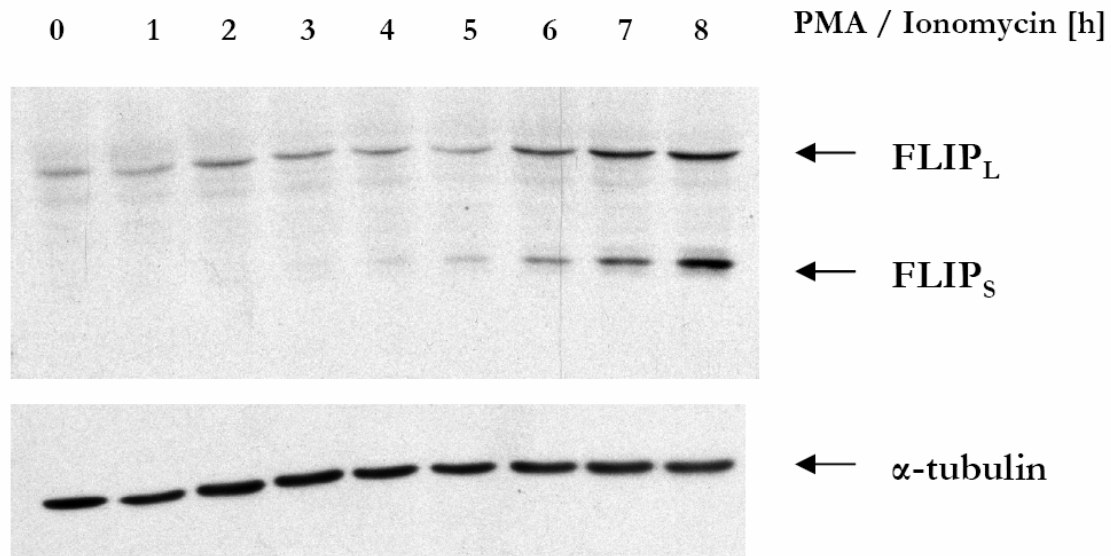


Abbildung 25. Induktion von c-FLIP in Jurkat T-Lymphocyten

Jurkat T-Lymphocyten wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die Expression von c-FLIP wurde mittels Western Blot analysiert.

Die Applikation von Signaltransduktionsinhibitoren, die in primären humanen T-Lymphocyten diese Induktion von c-FLIP verhindern, führt auch in Jurkat zu einem Verlust dieser Akkumulation (**Abb. 26**). Auch hier wurden die erhaltenen Ergebnisse unter Verwendung der alternativen Inhibitoren U0126, Wortmannin und FK 506 bestätigt (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen ist in Jurkat T-Lymphocyten die Expression von c-FLIP_R nicht oder nur sehr schwach detektierbar (Golks *et al.*, 2005).

Die TCR-abhängige Expression von c-FLIP-Proteinen scheint folglich in Jurkat T-Lymphocyten durch ähnliche Signalwege reguliert zu sein wie in primären humanen T-Lymphocyten.

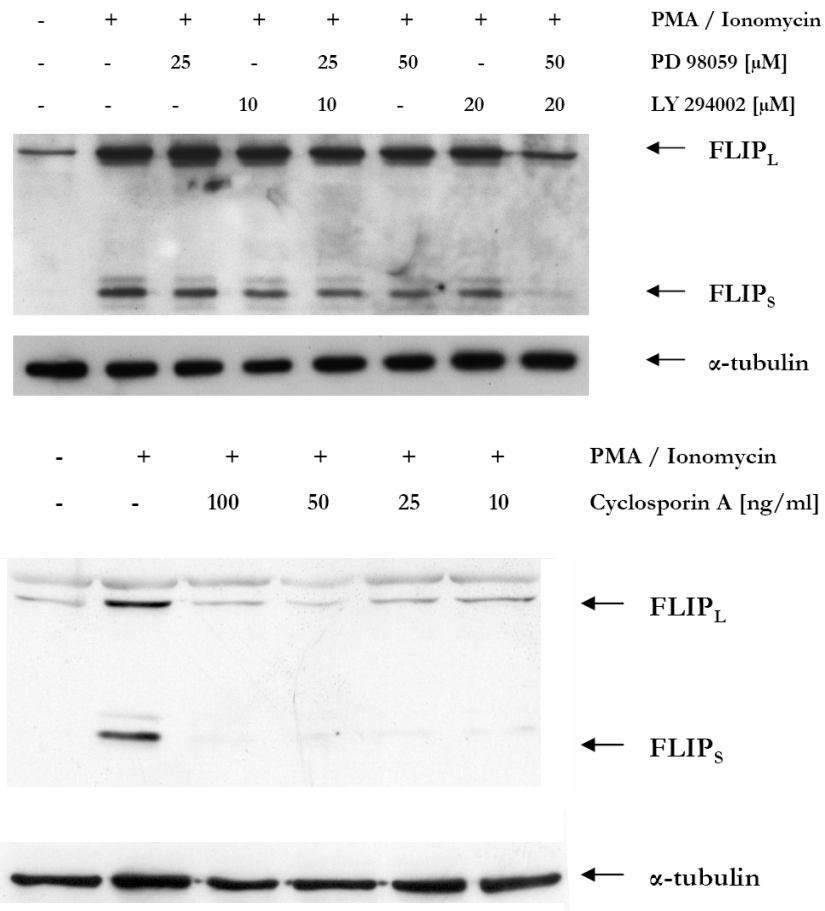


Abbildung 26. Inhibition von MEK, PI3K und Calcineurin inhibiert die Induktion von c-FLIP

Jurkat T-Lymphocyten wurden für 6 Stunden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Während der Stimulation wurden Inhibitoren von MEK1 (PD 98059), PI3K (LY 294002) oder Calcineurin (Cyclosporin A) zugegeben. Die Expression von c-FLIP wurde mittels Western Blot analysiert.

2.ii. Die Induktion von c-FLIP ist transkriptionell reguliert

Nach Stimulation von Jurkat T-Lymphocyten wurde die Expression der unterschiedlichen c-FLIP mRNAs mittels RT-PCR untersucht. In **Abb. 27** ist gezeigt, dass die Stimulation mit PMA und Ionomycin in dieser Zelllinie zur Induktion der Transkription von mRNAs für c-FLIP_L und c-FLIP_S führt. Diese Induktion lässt sich durch die bereits mehrfach eingesetzten Inhibitoren von MEK1 und PI3K verhindern (**Abb. 27**), Wiederholungen mit den Inhibitoren U0126, Wortmannin, Cyclosporin A und FK506 bestätigten diese Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Auch auf mRNA-Niveau lässt sich also in Jurkat das Regulationsmuster reproduzieren, das in primären humanen T-Lymphocyten beobachtet wird.

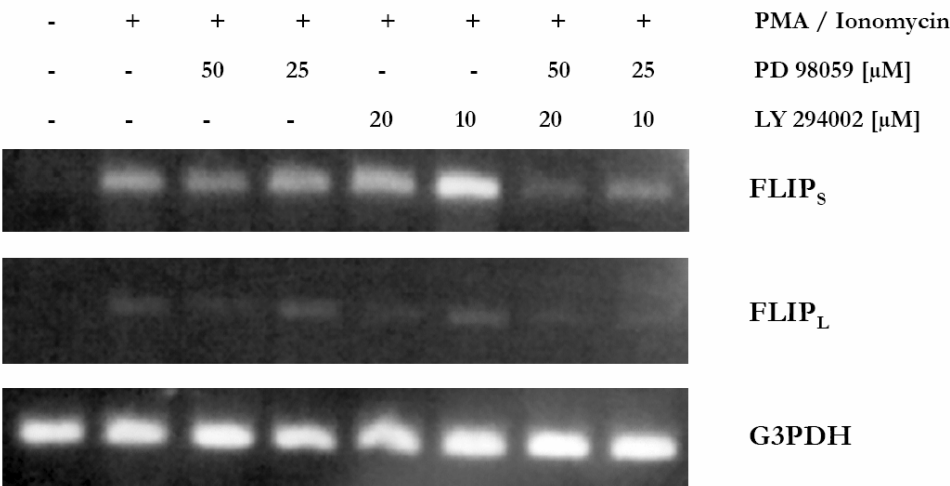


Abbildung 27. Transkriptionelle Regulation von c-FLIP in Jurkat
Jurkat T-Lymphocyten wurden mit PMA und Ionomycin in der Anwesenheit von MEK1- (PD 98059) oder PI3K-Inhibitoren (LY 294002) stimuliert. Die Expression von c-FLIP-mRNAs wurde mittels RT-PCR analysiert.

2.iii. Stimulation von Jurkat T-Lymphocyten induziert Expression von c-FLIP mRNAs mit unterschiedlichen 5'-untranslatierten Regionen

In primären humanen T-Lymphocyten wurde beobachtet, dass bei TCR-Stimulation selektiv die Expression von Transkripten mit Exon 2 in ihrer 5'-UTR induziert wird. Dies trifft nicht nur auf die Transkripte für c-FLIP_L und c-FLIP_s zu, deren 5'-Varianten bereits publiziert sind, sondern gilt auch für c-FLIP_R, für das derartige Varianten in dieser Arbeit erstmalig beschrieben werden.

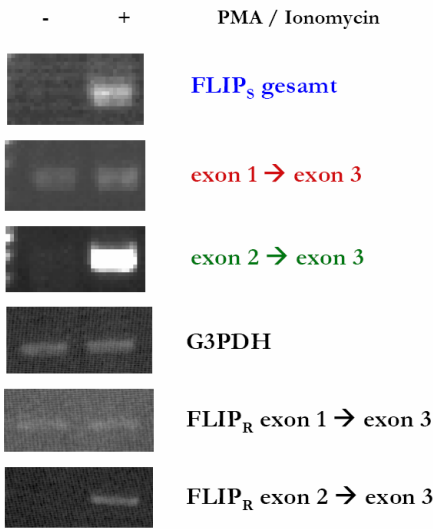


Abbildung 28. Stimulationsabhängige Expression von Exon 2 als 5'-UTR
Jurkat T-Lymphocyten wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert, und die Expression von 5'-untranslatierten Exons wurde mittels RT-PCR wie in Abb. 11 untersucht. Die Expression von c-FLIP_R-mRNAs mit Exon 1 bzw. Exon 2 in der 5'-UTR wurde ebenfalls per PCR analysiert.

Mittels RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass TCR-Stimulation in Jurkat T-Lymphocyten identische Signalwege reguliert. **Abb. 28** zeigt die selektive Induktion von Transkripten, die Exon 2 als 5'-UTR enthalten, und bestätigt in Jurkat T-Lymphocyten die Existenz zweier unterschiedlicher mRNAs für c-FLIP_R, die sich in ihrer 5'-UTR unterscheiden und parallel zu anderen Exon 1- bzw. Exon 2-enhaltenden mRNAs reguliert werden.

2.iv. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Jurkat T-Lymphocyten trotz ihrer bekannten Defekte in der Signaltransduktion (Abraham und Weiss, 2004) im Falle der TCR-abhängigen Regulation der c-FLIP-Expression ein vollwertiges Modellsystem für primäre humane T-Lymphocyten darstellen. Alle regulatorischen Phänomene, die in primärem Material beobachtet wurden, lassen sich in Jurkat reproduzieren. Deshalb wurde diese Zelllinie im Folgenden für weiterführende Analysen verwendet.

3. Identifikation und Analyse des Promoters von c-FLIP

Bisher konnte gezeigt werden, dass in TCR-stimulierten primären humanen T-Lymphocyten die Expression von c-FLIP in Abhängigkeit von MEK1, PI3K und Calcineurin induziert wird. Die Regulation dieses Effekts findet auf transkriptioneller Ebene statt. In ruhenden und voraktivierten T-Lymphocyten werden c-FLIP-mRNAs exprimiert, deren 5'-UTR aus Exon 1 besteht, während durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors zusätzlich die Expression von mRNAs induziert wird, die Exon 2 als 5'-UTR enthalten.

Alle Aspekte dieser Regulation sind vollständig in der T-Zelllinie Jurkat reproduzierbar. Dies erlaubt es, in den folgenden Experimenten dieses zelluläre System für weitere Studien einzusetzen.

3.i. Die 5'-Region des *cflar*-Gens enthält zwei potenzielle Promotoren

Die Expression von mRNAs mit unterschiedlichen, sich gegenseitig ausschließenden 5'-Termini kann durch zwei mögliche Mechanismen hervorgerufen werden: differentielles Splicing kann die unterschiedliche Exonzusammensetzung der Transkripte verursachen (Roberts *et al.*, 2005), oder die Transkription des *cflar*-Gens kann von zwei unterschiedlichen Promotoren reguliert werden. Die Existenz multipler Promotoren ist ein regulatorischer Einfluss, der die Expression vieler Gene beeinflusst (Ayoubi und Van De Ven, 1996; Chiu *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1999). Erst kürzlich wurde in einer genomweiten Studie der Anteil der Gene, die von mehreren Promotoren abhängen, auf bis zu 33% des humanen Genoms geschätzt (Kim *et al.*, 2005).

Um die transkriptionelle Regulation des *cflar*-Gens genauer zu studieren, wurden in der 5'-Region dieses Gens durch Homologiesuche gegen die Datenbank TRANSFAC® (Wingender *et al.*, 2001) potenzielle Promoter-Elemente identifiziert. **Abb. 29** zeigt schematisch, dass zwei Kandidatenregionen identifiziert wurden. Eine dieser Kandidatenregionen befindet sich 5' des ersten Exons im *cflar*-Gen und wird im Folgenden als pFLIP(1) bezeichnet, während sich eine zweite potenzielle Promoterregion im ersten Intron, 5' des zweiten Exons befindet und im Folgenden unter der Bezeichnung pFLIP(2) analysiert wird.

Beide Promoterregionen wurden durch PCR aus genomischer DNA isoliert und in den Luciferase-Reportervektor pGL3-basic kloniert.

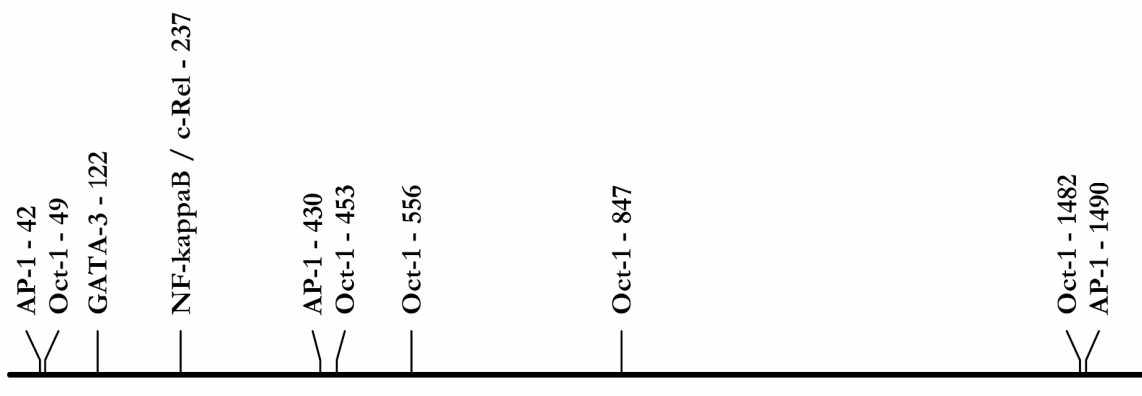


Abbildung 29. Lage der zwei Promotoren

Schematische Darstellung der potenziellen Promoterregionen pFLIP(1) und pFLIP(2) in Relation zum genomischen *cflar*-Locus.

3.ii. pFLIP(1) ist konstitutiv aktiv und reagiert nicht auf Stimulation

Wie in **Abb. 30** dargestellt ist, wurden in der potenziellen Promoterregion pFLIP(1) durch Homologiesuche Consensus-Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1, GATA-3 und Oct-1 vorhergesagt.



pFLIP(1)
1574 bp

Abbildung 30. Transkriptionsfaktor-Bindestellen in pFLIP(1)

Schematische Darstellung der potenziellen Promoterregion pFLIP(1). Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die durch Homologiesuche identifiziert wurden, sind dargestellt.

Um zu beurteilen, ob in dieser genomischen Region die regulatorischen Effekte ansetzen, die die Expression von c-FLIP in TCR-stimulierten T-Lymphocyten regulieren, wurden Jurkat T-Lymphocyten mit dem Luciferase-Reportervektor pGL3·pFLIP(1) transfiziert und mit PMA und Ionomycin stimuliert (**Abb. 31**). Die basale Luciferase-Expression, die von diesem Vektor verursacht wird, ist vergleichsweise hoch; jedoch lässt sich durch Stimulation der Zellen keine weitere Steigerung erreichen. Eine schwache Reaktivität des Leervektors pGL3 auf Stimulation der transfizierten Zellen mit PMA und Ionomycin ist vermutlich auf das Vorliegen von kryptischen Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Vektor selbst zurückzuführen (Dougherty und Sanders, 2005) und erlaubt es, das Ausmaß des experimentellen „Rauschens“ zu bewerten. Die Aktivität von pFLIP(1) korreliert mit der basalen Expression von c-FLIP-Transkripten, deren 5'-UTR das erste Exon des *cflar*-Gens beinhaltet.

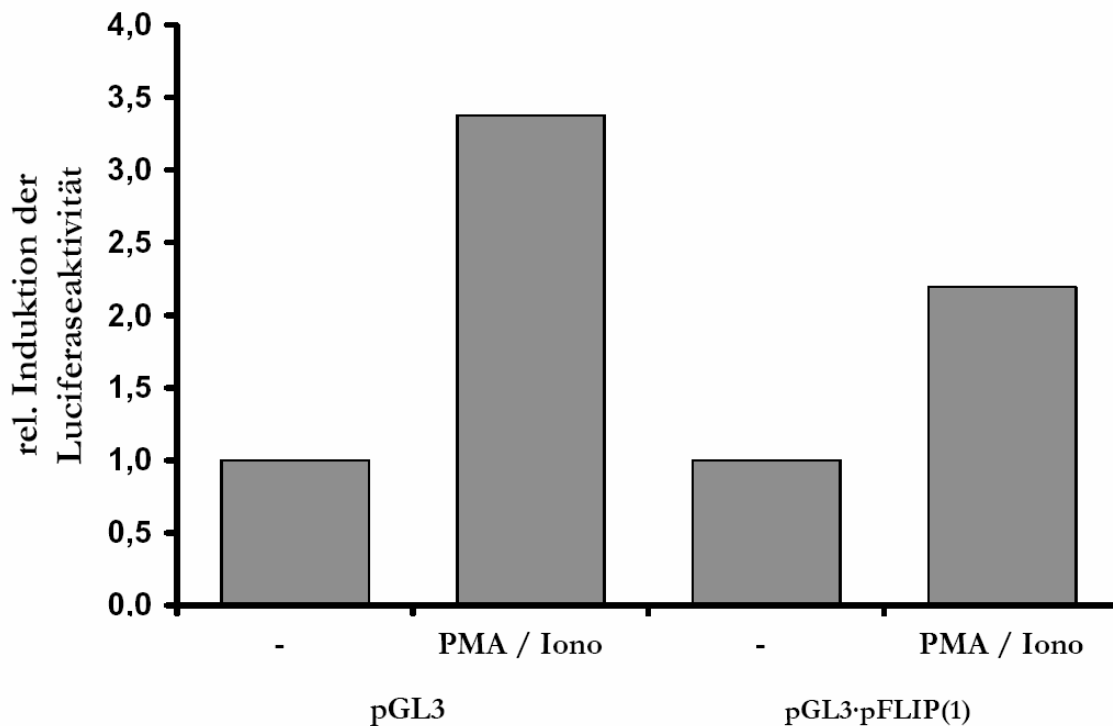


Abbildung 31. pFLIP(1) ist nicht induzierbar

Jurkat T-Lymphocyten wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Luciferaseaktivität wurde nach sechzehnständiger Stimulation mit PMA und Ionomycin bestimmt. Die Messwerte wurden auf die Luciferaseaktivität unstimulierter, transfizierter Zellen (Hintergrundexpression) normiert.

3.iii. Reporterexpression von pFLIP(2) ist durch Stimulation induzierbar

In **Abb. 32** ist eine schematische Darstellung der Consensus-Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die durch Homologiesuche in pFLIP(2) identifiziert wurden. Man erkennt auch in



pFLIP(2) 953 bp

Abbildung 32. Transkriptionsfaktor-Bindestellen in pFLIP(2)

Schematische Darstellung der potenziellen Promoterregion pFLIP(2). Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die durch Homologiesuche vorhergesagt wurden, sind dargestellt.

diesem genomischen Abschnitt Consensus-Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, deren Aktivierung generell mit TCR-Stimulation in Verbindung gebracht wird.

Wie in **Abb. 33** dargestellt ist, lässt sich die Expression des Reportergens in pGL3pFLIP(2) durch Stimulation transfizierter Jurkat T-Lymphocyten mit PMA und Ionomycin stark induzieren. Die Induzierbarkeit dieses Reporterkonstrukts ist gegenüber der Responsivität des Leervektors sehr stark erhöht, was die Vermutung nahe legt, dass diese genomische Region an der TCR-abhängigen Induktion von Exon 2-enthaltenden c-FLIP-mRNAs beteiligt ist.

Diese initialen Experimente deuten an, dass die beobachtete differentielle Expression von c-FLIP-Transkripten mit der Aktivität zweier differentiell aktivierter Promotoren erklärt werden könnte. Um diese Hypothese zu prüfen, wird im Folgenden versucht, die bisherigen Ergebnisse bezüglich der mRNA- und Proteinexpression von c-FLIP mit Hilfe von Reporterexpressionsexperimenten zu verifizieren.

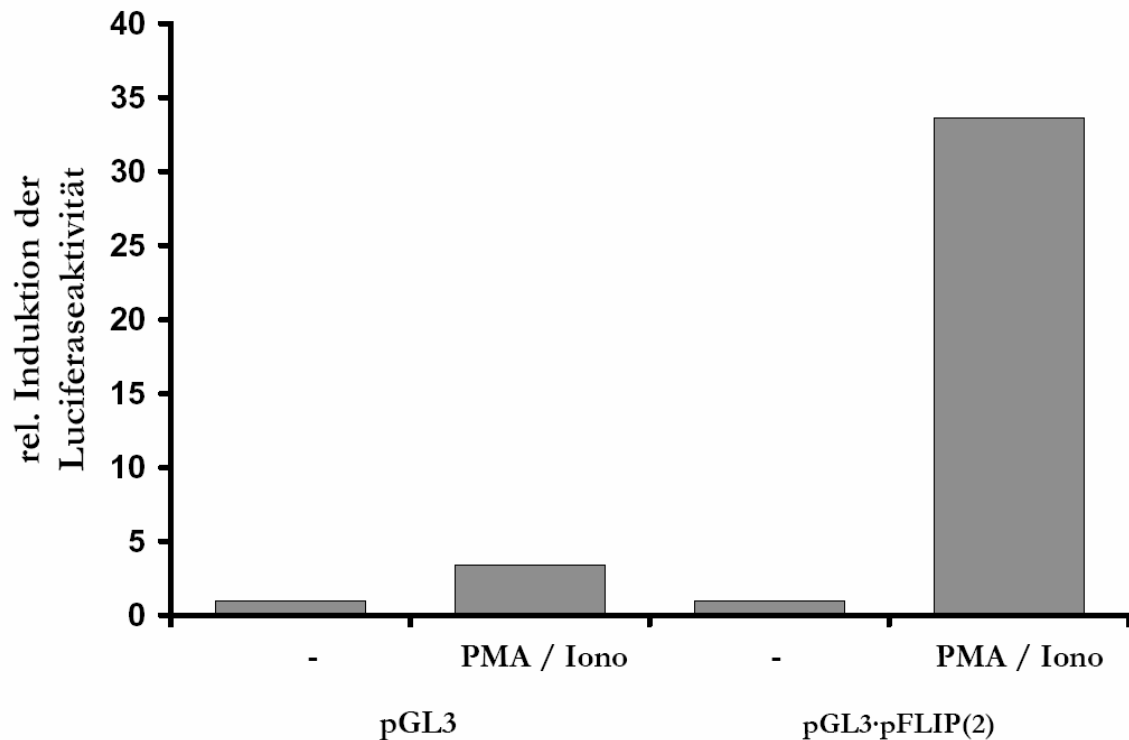


Abbildung 33. pFLIP(2) ist induzierbar

Jurkat T-Lymphocyten wurden mit den angegebenen Reportervektoren transfiziert und mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die experimentell ermittelte Luciferaseaktivität wurde gegen die Luciferaseaktivität nichtstimulierter Zellen normiert.

3.iv. Die Induktion von pFLIP(2) reagiert auf Signaltransduktionsinhibitoren

Falls die TCR-abhängige Expression von Exon 2-enthaltenden c-FLIP-mRNAs durch Aktivität von pFLIP(2) zu erklären ist, muss die Aktivität dieses Promoters durch Inhibition von MEK1, PI3K oder Calcineurin gehemmt werden. Die Prüfung dieser Hypothese ist in **Abb. 34** dargestellt: werden mit pGL3-pFLIP(2) transfizierte Jurkat T-Lymphocyten in Anwesenheit der Inhibitoren PD 98059, LY 294002 oder Cyclosporin A stimuliert, ist eine deutliche Reduktion der induzierten Luciferaseaktivität festzustellen. Die Behandlung mit PD 98059 führt im Western Blot zu einer Verringerung der c-FLIP-Expression (**Abb. 26**), während sie die Aktivität von pGL3-pFLIP(2) komplett inhibiert (**Abb. 34**). Dies ist vermutlich auf die schlechte quantitative Vergleichbarkeit beider Experimente zurück zu führen: während im Western Blot die endogen exprimierten Proteine analysiert werden, erstreckt sich die Analyse im Luciferase-Expressionsexperiment auf eine transient transfizierte Zellpopulation.

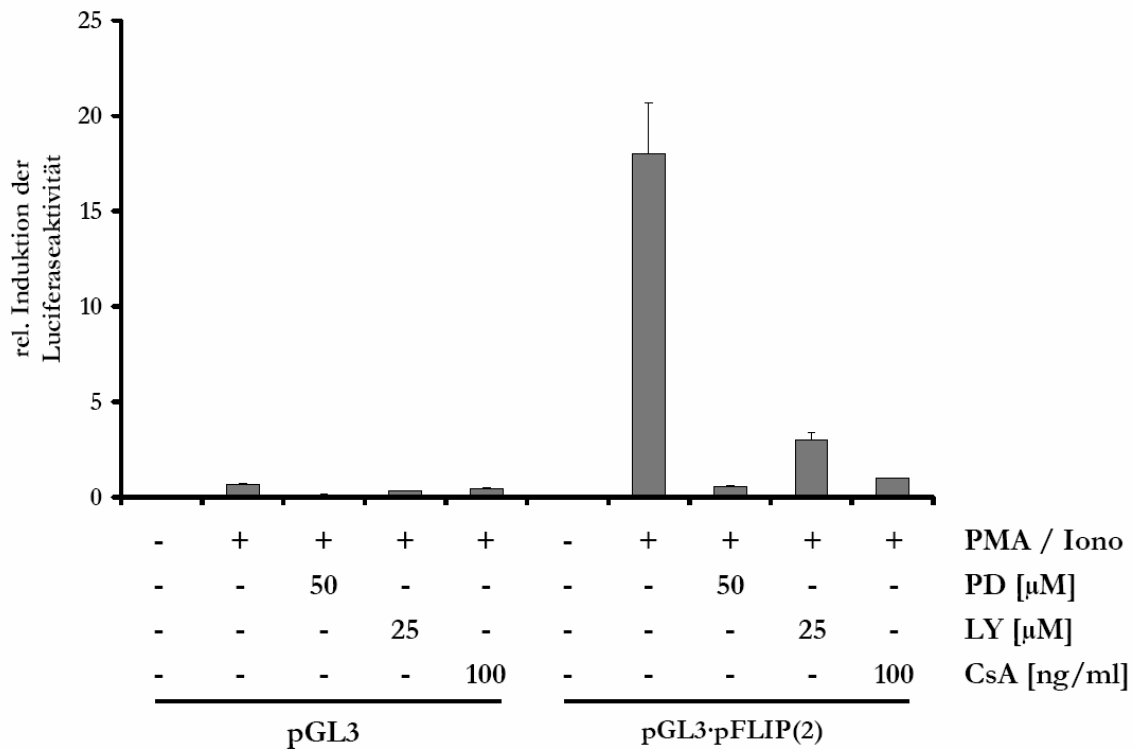


Abbildung 34. Inhibitionsprofil von pFLIP(2)

Jurkat T-Lymphocyten wurden mit den angegebenen Reporterexpressionsplasmiden transfiziert. Während der sechzehnständigen Stimulation mit PMA und Ionomycin wurden Inhibitoren von MEK1 (PD 98059), PI3K (LY 294002) und Calcineurin zugegeben. Gemessene Luciferaseaktivitäten wurden gegen die Luciferaseaktivität untransfizierter Zellen normiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus Sechsfachbestimmungen.

Die bisher erhaltenen Ergebnisse erlauben die Erklärung der in primären humanen T-Lymphocyten und in der T-Zelllinie Jurkat beobachteten c-FLIP-Expressionsmuster. Die basale Expression von c-FLIP in diesen Zelltypen beruht auf mRNAs, die das erste Exon des *cflar*-Gens beinhalten. Diese mRNA-Population wird konstitutiv exprimiert und lässt sich durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors nicht weiter induzieren. Dieses Expressionsmuster korreliert mit der deutlichen, nicht regulierten Aktivität, die pFLIP(1) im Luciferaseexpressionsexperiment zeigt.

Bei Stimulation des T-Zell-Rezeptors wird die Expression von c-FLIP-Proteinen erhöht. Diese Erhöhung ist verursacht durch die Neoexpression einer zweiten mRNA-Population, deren 5'-UTR das zweite Exon des *cflar*-Gens beinhaltet. Die Expression dieser mRNAs ist abhängig von MEK1, PI3K und Calcineurin. Dieses Expressionsmuster lässt sich mit der Aktivität des alternativen Promoters pFLIP(2) erklären, der 5' des zweiten Exons liegt und die Transkription an einem alternativen Startpunkt initiieren könnte.

In den folgenden Experimenten soll dieser bisher nicht bekannte alternative Promoter von c-FLIP genauer charakterisiert werden.

3.v. Serielle Deletionen erlauben die Identifikation einer Minimalregion in pFLIP(2)

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass pFLIP(2) eine essentielle Rolle in der transkriptionellen Regulation der c-FLIP-Expression in humanen T-Lymphocyten spielt. Um die essentiellen Regionen dieses Promoters einzugrenzen, wurden durch Exonuclease I-Verdau serielle Deletionen vom 5'-Ende her eingeführt (Details vgl. „Material und Methoden“). In **Abb. 35** sind diejenigen der erhaltenen Deletionsmutanten dargestellt, die im Folgenden verwendet wurden, um eine basale Promoterregion einzugrenzen..

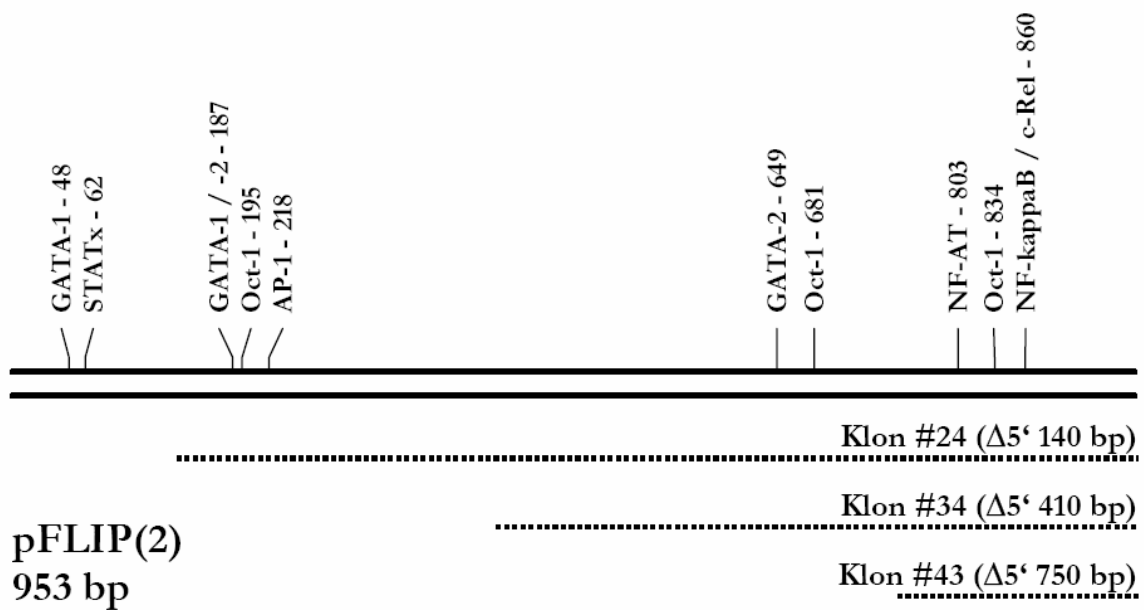


Abbildung 35. Deletionsmutanten von pFLIP(2)

Durch Exonuclease I-Verdau erhaltene, trunkierte Varianten von pFLIP(2).

In **Abb. 36** erkennt man, dass alle diese trunkierten Konstrukte in PMA- / Ionomycin-stimulierten Jurkat T-Lymphocyten transkriptionell aktiv sind. Die Reaktivität von pFLIP(2) scheint somit hauptsächlich durch eine Minimalregion von etwa 200 bp am 3'-Ende des Promoters abzuhängen.

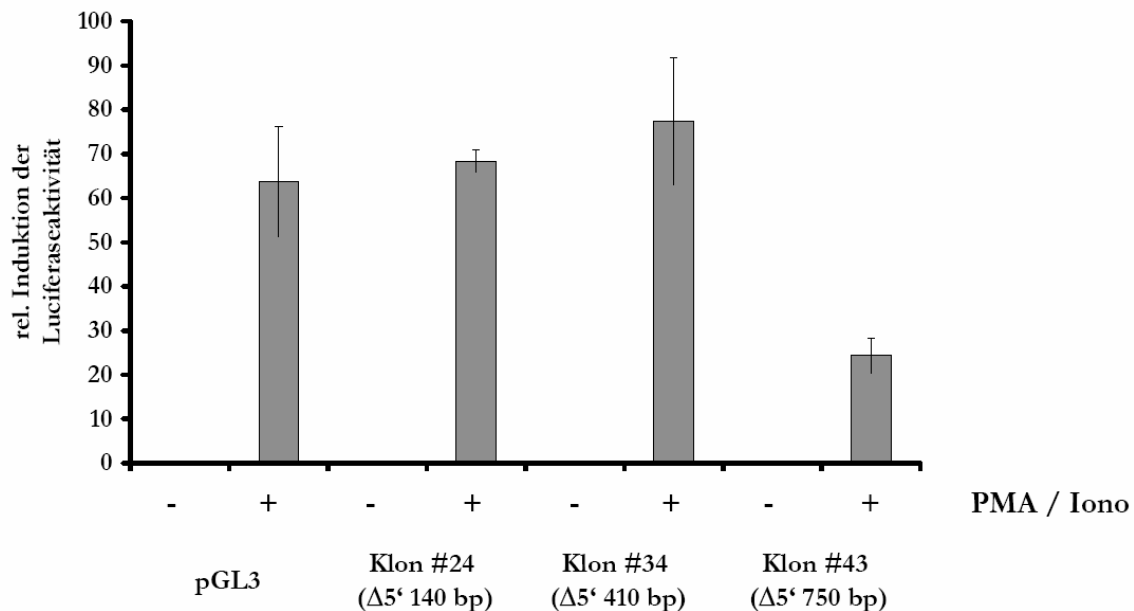


Abbildung 36. Alle Deletionsmutanten sind induzierbar

Jurkat T-Lymphocyten wurden mit den angegebenen Luciferase-Expressionsplasmiden transfiziert und mit PMA und Ionomycin stimuliert. Luciferaseaktivitäten wurden auf die Aktivität unstimulierter Zellen normiert.

In **Abb. 37** ist dargestellt, dass die Induzierbarkeit der kürzesten Deletionsmutante #43 durch die bereits mehrfach eingesetzten Inhibitoren von MEK1, PI3K und Calcineurin komplett inhibiert werden kann. Scheinbar liegen also die durch diese Signaltransduktionsmoleküle regulierten Elemente alle in dieser minimalen Promoterregion. Unter den durch Homologiesuche identifizierten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren fallen hier besonders NF-AT und NF- κ B auf, die als klassische Effektoren der T-Zell-Rezeptor-abhängigen Signaltransduktion gelten (Ruland und Mak, 2003; Weil und Israel, 2004). Die Relevanz dieser Bindestellen für die TCR-abhängige Expression von c-FLIP soll im Folgenden analysiert werden.

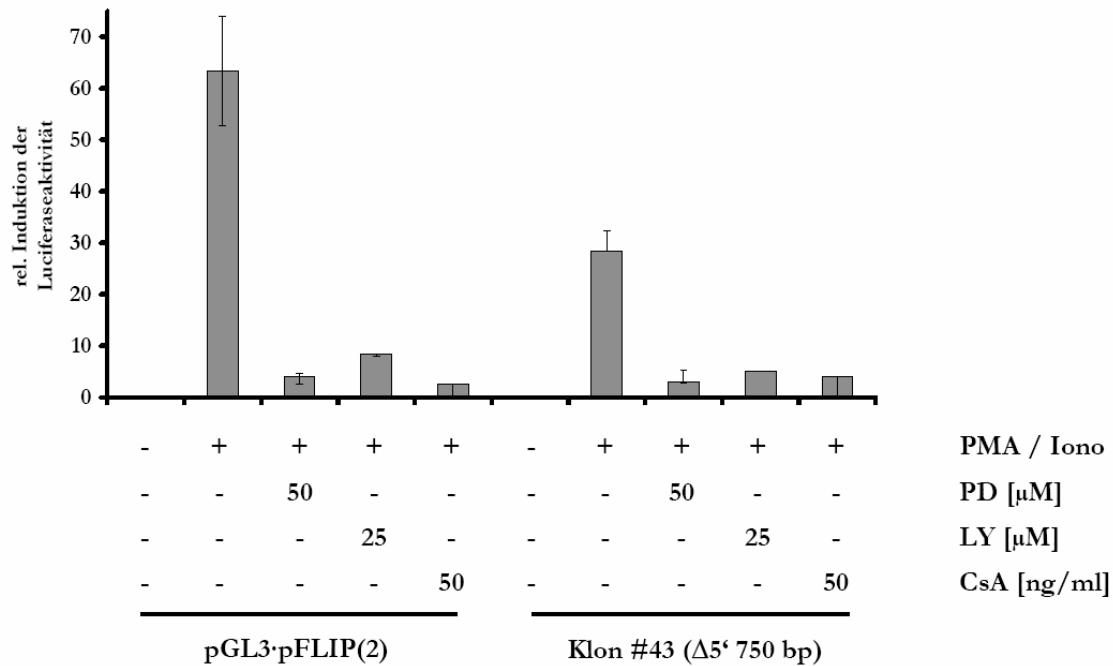


Abbildung 37. Inhibitionsprofil der kürzesten Deletionsmutante #43

Jurkat T-Lymphocyten wurden mit den angegebenen Luciferase-Expressionsplasmiden transfiziert und mit PMA und Ionomycin stimuliert. Inhibitoren von MEK1 (PD 98059), PI3K (LY 294002) und Calcineurin (Cyclosporin A) wurden während der Stimulation zugegeben. Luciferaseaktivitäten wurden auf die Aktivität unstimulierter Zellen normiert.

3.vi. Bindedomänen für die Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- κ B sind essentiell für die Induktion von pFLIP(2)

Um die Relevanz der Consensus-Bindestellen für NF- κ B und NF-AT für die TCR-abhängige Induktion von pFLIP(2) zu untersuchen, wurden mittels PCR inaktivierende Punktmutationen in pGL3-pFLIP(2) eingeführt. In **Abb. 38** ist zu erkennen, dass die Inaktivierung der NF-AT-Bindestelle zu einer deutlichen Reduktion der PMA- / Ionomycin-induzierbaren Luciferase-Expression in transfizierten Jurkat T-Lymphocyten führt, während die Inaktivierung der NF- κ B-Bindestelle die Induzierbarkeit von pFLIP(2) vollständig verhindert.

Die Neoexpression von Exon 2-enthaltenden c-FLIP-mRNAs scheint folglich von der Aktivität von pFLIP(2) abhängig zu sein. Die wichtigsten Elemente, die die Regulation von pFLIP(2) vermitteln, sind im 3'-terminalen Bereich des Promoters zu finden. Eine Bindestelle für NF- κ B in diesem Bereich ist für die transkriptionelle Induktion von c-FLIP unabdingbar.

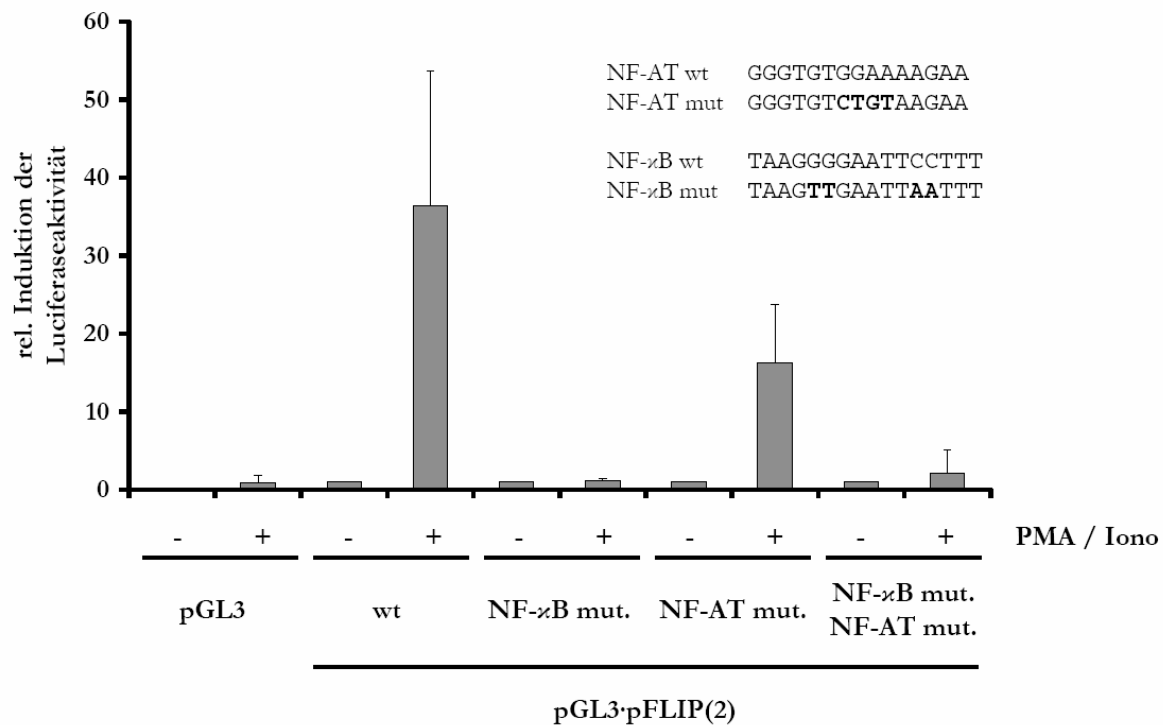


Abbildung 38. Inaktivierung der NF-AT- und NF-κB-Bindestellen verringert Induzierbarkeit von pFLIP(2)

Durch PCR-vermittelte Mutagenese wurden die NF-AT- und NF-κB-Bindestellen in pGL3·pFLIP(2) inaktiviert. Die resultierenden Luciferase-Reporterexpressionsplasmide wurden in Jurkat T-Lymphocyten auf Induzierbarkeit durch PMA- / Ionomycin-Stimulation getestet.

Parallel wurden Jurkat T-Lymphocyten mit zwei Reportervektoren transfiziert, die mehrfache Tandem-Wiederholungen einer NF-AT- bzw. NF-κB-Bindestelle und einen Minimalpromoter enthalten. Diese Reporterplasmide können als Indikatoren für die Aktivität der jeweiligen Transkriptionsfaktoren eingesetzt werden (Proksch *et al.*, 2005). **Abb. 39** zeigt die Aktivität von NF-AT und NF-κB in stimulierten Jurkat T-Lymphocyten in der Anwesenheit der bisher verwendeten Signaltransduktionsinhibitoren. Man erkennt, dass die Inhibition von Calcineurin zu einer kompletten Blockade von NF-AT und NF-κB führt. Inhibition von PI3K hat einen moderat inhibitorischen Effekt auf beide Transkriptionsfaktoren, während die Inhibition von MEK1 hauptsächlich die Aktivität von NF-AT blockiert.

Dieses Experiment erlaubt eine Abschätzung der Wirkmechanismen der eingesetzten Inhibitoren: während Cyclosporin A sowohl NF-AT als auch NF-κB inhibiert und so zu einer vollständigen Inaktivierung der pFLIP(2)-abhängigen Transkription führt, wird durch PD 98059 oder LY 294002 nur die Aktivität jeweils eines Transkriptionsfaktors gehemmt.

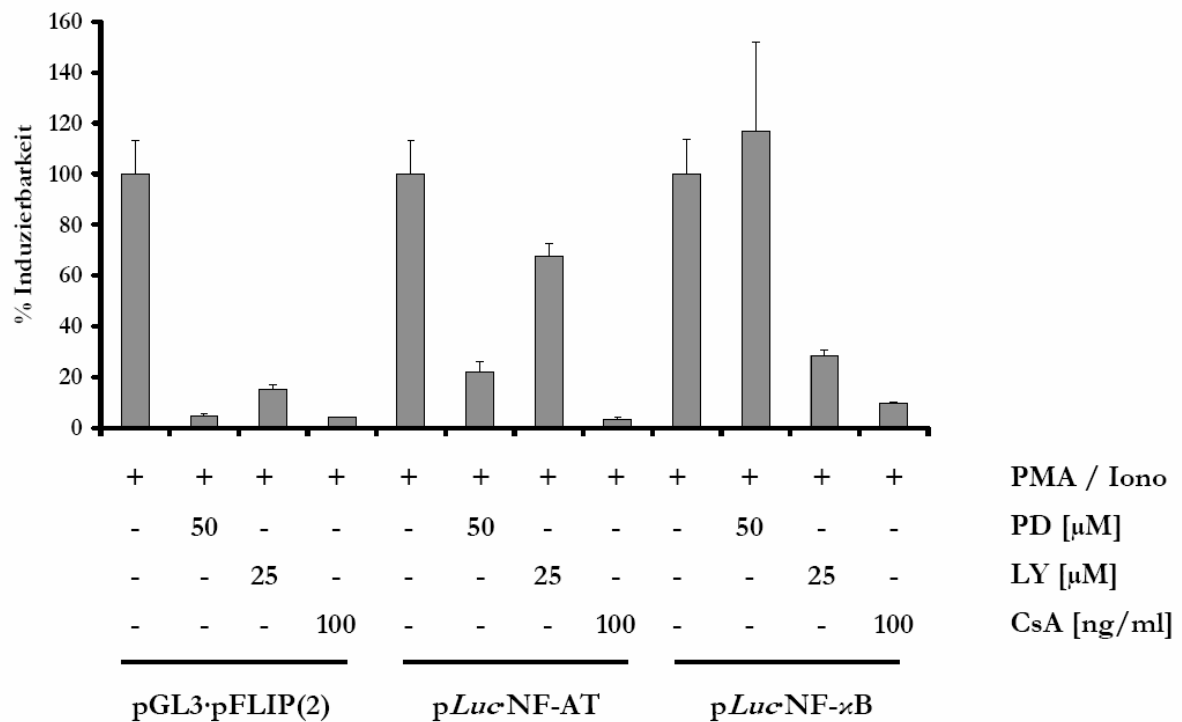


Abbildung 39. Inhibitionsprofil von NF-κB- und NF-AT-Reporterkonstrukten

Jurkat T-Lymphocyten wurden mit den angegebenen Luciferase-Reporterexpressionsplasmiden transfiziert und mit PMA und Ionomycin stimuliert. Während der Stimulation wurden Inhibitoren von MEK1 (PD 98059), PI3K (LY 294002) und Calcineurin (Cyclosporin A) zugegeben. Die experimentell ermittelten Luciferaseaktivitäten wurden auf die Luciferaseaktivität in stimulierten Zellen ohne Inhibitorzugabe normiert. 100% Aktivität entsprechen einer relativen Induktion von 90 (pGL3-pFLIP(2)), 17 (pLucNF-AT), bzw. 217 (pLucNF-κB) arbiträren Einheiten.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des wichtigen antiapoptotischen Effektors c-FLIP in primären humanen T-Lymphocyten und der T-Zelllinie Jurkat untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Stimulation des Antigenrezeptors in diesen Zellen zu erhöhter Expression von c-FLIP führt, und dass diese Induktion von den Signalmolekülen MEK1, PI3K und Calcineurin abhängt. Diese Induktion von c-FLIP tritt sowohl in Apoptose- und AICD-resistenten naiven T-Lymphocyten als auch in AICD-sensitiven voraktivierten T-Lymphocyten während der TCR-Restimulation auf.

Die basale Expression von c-FLIP ist zurückzuführen auf eine mRNA-Population, deren 5'-UTR aus Exon 1 des *cflar*-Gens besteht. Durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors wird die Expression einer zweiten mRNA-Population induziert, die Exon 2 als 5'-UTR enthält. Die Neoexpression dieser mRNA-Population kann durch Inhibition von MEK1, PI3K und Calcineurin verhindert werden.

Erstmalig wurde in dieser Arbeit außerdem gezeigt, dass die dritte endogen exprimierte Variante von c-FLIP, c-FLIP_R, analog zu c-FLIP_L und c-FLIP_S von zwei unterschiedlichen mRNAs codiert wird, die entweder Exon 1 oder Exon 2 als 5'-UTR enthalten.

Das Vorliegen dieser zwei mRNA-Populationen erklärt sich aus der Existenz zweier Promotoren im *cflar*-Gen. Der Promoter pFLIP(1), der sich 5' des ersten Exons befindet, wird in primären humanen T-Lymphocyten und der T-Zelllinie Jurkat konstitutiv exprimiert und zeigt keine Induzierbarkeit nach TCR-Stimulation. Im Gegensatz hierzu geht vom Promoter pFLIP(2), der 5' des zweiten Exons liegt, keine Basalaktivität aus. Expression von pFLIP(2) wird durch TCR-Stimulation stark induziert, lässt sich durch Inhibition von MEK1, PI3K und Calcineurin supprimieren, und hängt von NF-AT- und NF- κ B-Bindestellen im 3'-terminalen Bereich des Promoters ab.

Diskussion

1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Der antiapoptotische Effektor c-FLIP ist von herausragender Bedeutung für die Entwicklung des Immunsystems (Zhang und He, 2005b) und für die Funktion reifer Lymphocyten (Arreaza *et al.*, 2003; Dohrman *et al.*, 2005; Hennino *et al.*, 2000; Hennino *et al.*, 2001; Kataoka und Tschopp, 2004; Kirchhoff *et al.*, 2000a; Lens *et al.*, 2002; Schmitz *et al.*, 2004; Van Parijs *et al.*, 1999a; Wang *et al.*, 2000). Die Rolle von c-FLIP als Determinante der Apoptose-Sensitivität von T-Lymphocyten wurde sowohl *in vivo* als auch *in silico* bestätigt (Bentele *et al.*, 2004; Zhang und He, 2005b), während andere Beobachtungen, die c-FLIP als Effektormolekül des T-Zell-Rezeptors, als Aktivator von NF- κ B oder als Cofaktor für die Aktivierung von Caspase-8 definieren, sich bisher nur auf *in vitro*-Daten stützen (Dohrman *et al.*, 2005; Kataoka und Tschopp, 2004; Lens *et al.*, 2002).

Stimulation des Antigenrezeptors führt zu einer Verringerung der Apoptosesensitivität in B- und T-Lymphocyten (Kirchhoff *et al.*, 2000a; Schmitz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2000), die vermutlich durch erhöhte Expression von c-FLIP verursacht ist.

In dieser Arbeit wurde die TCR-abhängige Expression von c-FLIP untersucht und die transkriptionelle Regulation des *cflar*-Gens analysiert. Die Ergebnisse demonstrieren komplexe transkriptionelle Regulationsmuster in Abhängigkeit von zwei Promotoren, während sie eine selektive Regulation einzelner Proteinvarianten (Kirchhoff *et al.*, 2000a; Kirchhoff *et al.*, 2000b) nicht bestätigen können. Vermutlich ist diese Beobachtung (Kirchhoff *et al.*, 2000b) darauf zurück zu führen, dass das C-terminal verkürzte Spaltprodukt von c-FLIP_L intrazellulär schneller abgebaut wird als das unverkürzte Protein. Alternativ wäre denkbar, dass die C-terminale Trunkierung die Affinität des NF6-Antikörpers zu seinem Antigen negativ beeinflusst.

1.i. c-FLIP-Expression in primären humanen T-Lymphocyten

In primären humanen T-Lymphocyten wurde gezeigt, dass die Expression aller Splicevarianten von c-FLIP durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors induziert wird. Diese Induktion ist transkriptionell und kann in Übereinstimmung mit bereits publizierten Studien (Madge *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002) durch Inhibition von MAPK- oder PI3K-Signalwegen inhibiert werden. Des Weiteren ist diese transkriptionelle Induktion von der Aktivität der Phosphatase Calcineurin abhängig.

Eine genaue Analyse der c-FLIP-Transkripte, die in ruhenden oder voraktivierten primären T-Lymphocyten vor und nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors exprimiert werden, zeigte die Existenz zweier distinkter Transkriptpopulationen: c-FLIP-Transkripte, deren 5'-UTR das erste Exon des *cflar*-Gens enthalten, werden in T-Lymphocyten konstitutiv, ungeachtet ihres Aktivierungszustandes, exprimiert, während die Stimulation des Antigenrezeptors zu selektiver, transkriptioneller Induktion einer zweiten Transkriptpopulation führt, deren 5'-UTR aus dem zweiten Exon des *cflar*-Gens besteht (Abb. 40). Bisher war bekannt, dass solche Transkriptvarianten für die Expression von c-FLIP_L- und c-FLIP_S-Proteinen existieren (mRNAs sind unter den Bezeichnungen c-FLIP_L (Exon 1), Usurpin- α (Exon 2), CASH- β (Exon 1) und c-FLIP_S (Exon 2) publiziert (Goltsev *et al.*, 1997; Irmeler *et al.*, 1997a; Irmeler *et al.*, 1997b; Rasper *et*

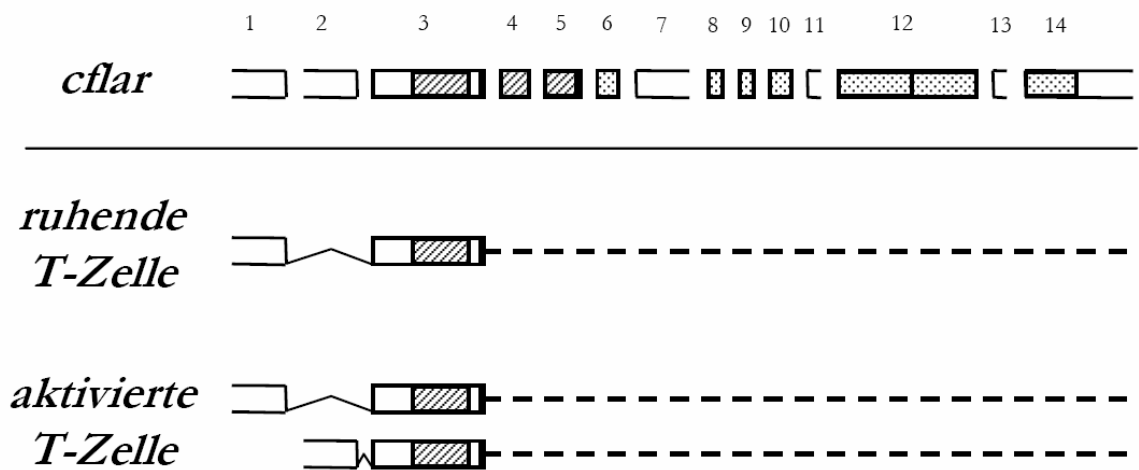


Abbildung 40. Transkriptverteilung in ruhenden und aktivierten T-Lymphocyten

In naiven oder voraktivierten primären humanen T-Lymphocyten werden c-FLIP-mRNAs exprimiert, deren 5'-UTR aus Exon 1 des *cflar*-Gens besteht. Expression dieser mRNAs bleibt bei Stimulation des T-Zell-Rezeptors erhalten; zusätzlich kann man Expression von c-FLIP-mRNAs beobachten, deren 5'-UTR das zweite Exon des *cflar*-Gens enthält.

al., 1998)). In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass diese Transkriptvarianten differentiell in Abhängigkeit von TCR-Stimulation exprimiert werden. Außerdem wurde gezeigt, dass analog aufgebaute Varianten auch für die dritte endogen exprimierte Variante von c-FLIP, das Protein c-FLIP_R (Djerbi *et al.*, 2001), existieren.

1.ii. c-FLIP-Expression in Jurkat T-Lymphocyten

Jurkat T-Lymphocyten sind eines der meistbenutzten Modellsysteme für TCR-abhängige Signaltransduktion (Abraham und Weiss, 2004). Da Experimente in primären humanen T-Lymphocyten durch interindividuelle Variation, geringe Verfügbarkeit und schlechte

Transfizierbarkeit dieser Zellen nur eingeschränkt möglich sind, wurde für weitere Studien überprüft, ob die in primären T-Lymphocyten gewonnenen Ergebnisse auf diese Modell-Zelllinie übertragen werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Jurkat T-Lymphocyten mit dem Phorbolster PMA und dem Calcium-Ionophor Ionomycin ausreicht, um die Expression von c-FLIP zu induzieren. Diese Neoexpression ist ebenfalls abhängig von Signaltransduktion durch MEK1, PI3K und Calcineurin. Des Weiteren wurden auch in Jurkat T-Lymphocyten zwei unterschiedliche Populationen von c-FLIP-mRNAs identifiziert, deren Expression analog zu primären humanen T-Lymphocyten reguliert wurde. Auch in Jurkat T-Lymphocyten wurde das Vorhandensein zweier c-FLIP_R-mRNAs mit unterschiedlichen 5'-UTR bestätigt.

Nachdem bestätigt werden konnte, dass die regulatorischen Phänomene in primären humanen T-Lymphocyten im Jurkat-Modellsystem reproduziert werden können, wurde die Promoterregion des *cflar*-Gens unter Verwendung dieser Zelllinie analysiert.

1.iii. Zwei Promotoren steuern die Expression von c-FLIP in T-Lymphocyten

Die Regulation von c-FLIP wurde bisher nur phänomenologisch analysiert. In bisher publizierten Studien wurde unter Verwendung von Signaltransduktionsinhibitoren oder molekularen Eingriffen durch siRNA, antisense- oder dominant-negative Techniken eine Verbindung zwischen NF- κ B-Signaltransduktion und der Expression von c-FLIP etabliert (Micheau *et al.*, 2001). In einer unlängst erschienen Studie wurde ein DNA-Fragment aus dem *cflar*-Gen in Prostatakarzinom-Zelllinien auf Regulation durch den Androgenrezeptor untersucht (Gao *et al.*, 2005); aus den Informationen, die in dieser Veröffentlichung zur Verfügung gestellt werden, ist jedoch nicht ersichtlich, welchen genomischen Bereich die Autoren analysierten.

In dieser Arbeit wurden die in primären humanen T-Lymphocyten beobachteten und in Jurkat T-Lymphocyten reproduzierten Einflüsse von TCR-Stimulation auf die Expression von c-FLIP auf Promoterebene analysiert (**Abb. 41**).

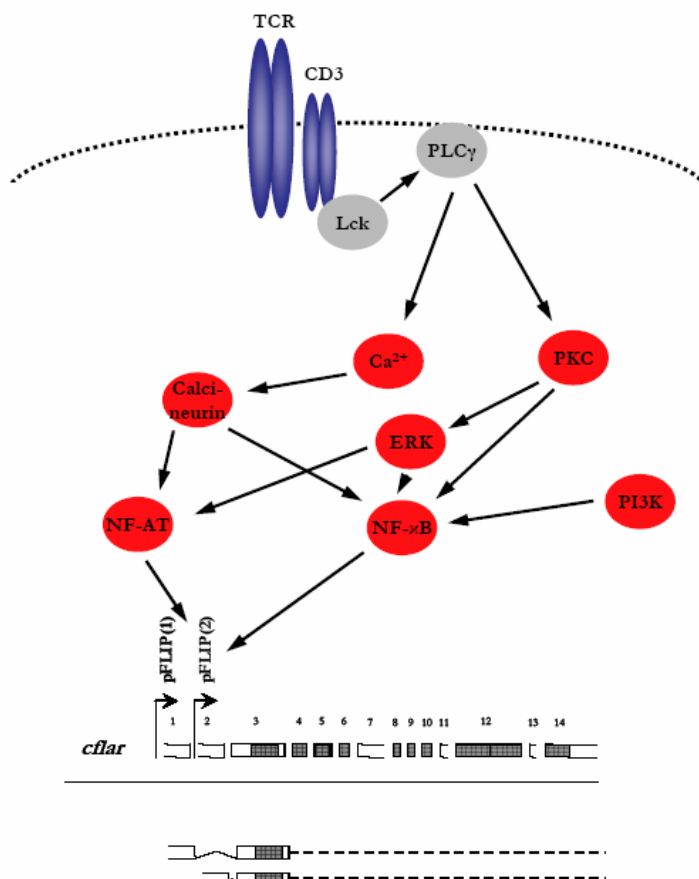
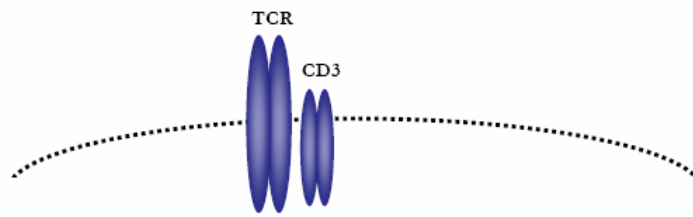


Abbildung 41. Regulation von pFLIP(2)

In ruhenden T-Lymphocyten (oben) ist pFLIP(1) aktiv, pFLIP(2) dagegen inaktiv. Es werden ausschließlich c-FLIP-mRNAs exprimiert, die Exon 1 als 5'-UTR enthalten.

Bei Stimulation des T-Zell-Rezeptors (unten) werden TCR-proximale Effektoren wie Lck und PLC- γ_1 aktiviert. Die Aktivität von PLC- γ_1 führt zur Freisetzung der second messenger Ca²⁺ und Diacylglycerol. Diese wiederum aktivieren PKC-Isoenzyme und die Phosphatase Calcineurin. Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- κ B führt zu transkriptioneller Aktivität von pFLIP(2) und zur Expression von Exon-2-enhaltenden c-FLIP-mRNAs.

Es wurde festgestellt, dass die Expression von c-FLIP in T-Lymphocyten von zwei Promotoren abhängt: ein konstitutiv aktiver Promoter am ersten Exon des *cflar*-Gens verursacht die Expression von Exon-1-enthaltenden mRNAs, während ein zweiter Promoter im ersten Intron des *cflar*-Gens nur nach Stimulation des Antigenrezeptors aktiv ist. Die Aktivität dieses Promoters erklärt das stimulationsabhängige Auftreten von mRNAs, deren 5'-UTR Exon 2 des *cflar*-gens enthält. Der Promoter am zweiten Exon, pFLIP(2), zeigt keine Basalaktivität und ist durch Stimulation mit PMA und Ionomycin stark induzierbar. Diese Induzierbarkeit lässt sich durch Inhibition von MEK1, PI3K und Calcineurin unterdrücken. Die Regulation von pFLIP(2), die das Expressionsverhalten von Exon-2-enthaltenden mRNAs reproduziert, ist abhängig von je einer NF- κ B- und NF-AT-Bindestelle im 3'-Bereich des Promoters. Die verwendeten Inhibitoren inhibieren die Aktivität der entsprechenden Transkriptionsfaktoren.

2. c-FLIP in T-Lymphocyten

Multiple Promotoren regulieren die Expression vieler Gene. In einer kürzlich erschienenen Untersuchung (Kim *et al.*, 2005) wurde festgestellt, dass die 5'-Regionen vieler Gene mehrere Promotoren aufweisen. Alternative Nutzung dieser Promotoren wird für Variationen in der 5'-UTR dieser Gene verantwortlich gemacht.

Die Tatsache, dass die basale Expression von c-FLIP in T-Lymphocyten von einem anderen Promoter abhängt als die TCR-abhängige Expression nach Stimulation, ist überraschend, und die Analyse der 5'-UTR von c-FLIP-Transkripten in anderen Gewebe- und Zelltypen dürfte von großem Interesse sein.

Das Expressionsniveau von c-FLIP scheint eine der wichtigsten Determinanten von Apoptoseresistenz in T-Lymphocyten zu sein (Bentele *et al.*, 2004; Zhang und He, 2005b), und Überexpression von c-FLIP in T- und B-Lymphocyten schützt diese vor Aktivierungs-Induziertem Zelltod und verursacht Autoimmunität (Van Parijs *et al.*, 1999a). Totalverlust von c-FLIP in T-Lymphocyten hingegen führt zu dramatischer Sensitivierung gegen Todesrezeptor- oder aktivierungsinduzierte Apoptose (Kataoka *et al.*, 2002; Sharp *et al.*, 2005; Zhang und He, 2005b). Basale Expression von c-FLIP in T-Lymphocyten scheint folglich für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase erforderlich zu sein, wohingegen die aktivierungsabhängige Erhöhung der c-FLIP-Expression zu einer Erhöhung der Apoptoseresistenz führt.

Die hier präsentierten Ergebnisse erlauben eine molekulare Differenzierung zwischen basal exprimierten c-FLIP-mRNAs und aktivierungsabhängig induzierten c-FLIP-Transkripten. Durch antisense- oder RNA-Interferenz-basierte Intervention könnte eine selektive Depletion Exon-2-enthaltender c-FLIP-mRNAs vorgenommen werden, die die Resistenz frisch aktivierter T-Lymphocyten gegen Todesrezeptor-induzierte Apoptose verringern sollte. Durch Ausnutzung dieses molekularen Unterschieds könnte somit eine Resensitivierung und möglicherweise Eliminierung konstitutiv aktivierter T-Lymphocyten, die beispielsweise in Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen (Howard *et al.*, 2005), ermöglicht werden.

3. Weiterführende Experimente und Ausblick

Die hier präsentierten Ergebnisse eröffnen eine Vielzahl weiterer Analysemöglichkeiten. Einige Möglichkeiten für weitere Analysen sollen im Folgenden aufgeführt werden.

3.i. Weitere Charakterisierung von pFLIP(2)

Die bisher präsentierten Ergebnisse belegen eine Beteiligung von Transkriptionsfaktoren der NF-AT- und NF- κ B-Familien an der transkriptionellen Regulation von c-FLIP über pFLIP(2). Um diesen Zusammenhang experimentell weiter zu charakterisieren, muss die Interaktion zwischen den genannten Transkriptionsfaktoren und ihren *in silico* determinierten Bindestellen auf pFLIP(2) *in vitro* analysiert werden. Hierzu bieten sich zwei experimentelle Systeme an.

Durch electrophoretic mobility shift (EMSA) kann *in vitro* die Bindung von Proteinen an radioaktiv markierte Oligonukleotid-Sonden nachgewiesen werden. Hierzu werden doppelsträngige DNA-Sonden radioaktiv markiert und mit dem zu analysierenden Interaktionspartner inkubiert. Dieser kann entweder als rekombinantes Protein zugegeben werden oder in einem komplexen Gemisch, beispielsweise einem Zellkernlysate, enthalten sein. Die Bindung des Proteins an die Sonde wird durch native Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie nachgewiesen; Protein-DNA-Komplexe werden aufgrund ihrer langsameren Migrationsgeschwindigkeit detektiert. Eine Analyse der an der Bindung beteiligten Untereinheiten des jeweiligen Transkriptionsfaktoren kann durch Zugabe spezifischer Antikörper zur Bindungsreaktion durchgeführt werden (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit DNA kann auch *in vivo* durch Chromatin-Immunpräzipitation analysiert werden. Hier werden Protein-DNA-Komplexe vor der Lyse der Zelle durch Behandlung mit Formaldehyd quervernetzt. Nach Fragmentierung der zellulären DNA wird der gewünschte Transkriptionsfaktor immunpräzipitiert. Die mit dem

Immunkomplex copräzipitierte DNA wird eluiert und durch PCR analysiert (Sambrook *et al.*, 1989).

3.ii. Expression von c-FLIP in anderen hämatopoetischen Zellen

Die hier gezeigten Experimente dienten zur Analyse der Expression von c-FLIP in T-Lymphocyten. Allerdings wurde berichtet, dass c-FLIP auch für die Funktion und Differenzierung anderer Zelltypen des Immunsystems eine wichtige Rolle spielt. So wurde berichtet, dass die Expression von c-FLIP_L in B-Zell-Rezeptor-stimulierten B-Lymphocyten zu erhöhter Resistenz gegen Todesrezeptor-induzierte Apoptose führt (Hennino *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000), und dass c-FLIP für das Überleben von B-Zellen nach erfolgter Affinitätsreifung essentiell ist (Hennino *et al.*, 2001). Des weiteren ist bei der Differenzierung von Monocyten zu Macrophagen ein Anstieg der c-FLIP-Expression mit Desensitivierung gegen CD95 zu beobachten (Perlman *et al.*, 1999). Auch in dendritischen Zellen wird c-FLIP während der Differenzierung induziert; dendritische Zellen sind nach ihrer Ausdifferenzierung erheblich resistenter gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose (Leverkus *et al.*, 2000).

Auch in diesen Zelltypen dürfte es von Interesse sein, die Beteiligung der beiden hier identifizierten Promotoren an der Desensitivierung der jeweiligen Zelltypen gegen Todesrezeptorligation zu analysieren. Sollte auch in diesen Zelltypen eine differentielle Regulation von pFLIP(1) und pFLIP(2) vorliegen, wäre die Möglichkeit einer therapeutischen Beeinflussung über antisense- oder RNA-Interferenz-Methoden gegen die 5'-UTR nahe liegend.

Wird in Thymocyten durch Lck-Cre-vermittelte Rekombination c-FLIP deletiert, so ist die Entwicklung reifer α/β -TCR-enthaltender T-Lymphocyten eingeschränkt. Hingegen können γ/δ -TCR-tragende T-Lymphocyten uneingeschränkt ausgebildet werden (Zhang und He, 2005b). Dies deutet an, dass die Expression von c-FLIP für diesen Zelltyp weniger essentiell ist als für α/β -T-Lymphocyten. Die Analyse von c-FLIP-Transkripten in den unterschiedlichen thymischen Entwicklungsstadien von T-Lymphocyten beider Linien könnte hier weitere Hinweise liefern.

3.iii. Analyse der Rolle von c-FLIP mit Hilfe transgener Tiermodelle

Die Exon-Intron-Organisation des *cflar*-Locus ist zwischen Maus und Mensch hochkonserviert. Das legt die Vermutung nahe, dass in murinen T-Lymphocyten ähnliche Regulationsmuster vorliegen, wie sie in der vorliegenden Arbeit für das humane System beschrieben wurden.

Bei der positiven Selektion von Thymocyten scheint c-FLIP eine wichtige Rolle zu spielen. c-FLIP-defiziente Thymocyten werden beim Übergang vom CD4⁺CD8⁺ doppelt-positiven

Stadium zu CD4⁺ oder CD8⁺ positiven, reifen T-Lymphocyten eliminiert (Zhang und He, 2005b). Dies deutet darauf hin, dass die Expression von c-FLIP in diesem Stadium der T-Zellentwicklung essentiell ist. Möglicherweise empfangen Thymocyten während dieses Schrittes im Reifungsprozess ein Todesrezeptorsignal, das in Abwesenheit von c-FLIP zu ihrer Eliminierung führt.

Um die mögliche Relevanz von c-FLIP für die thymischen Selektionsprozesse zu untersuchen, wäre es denkbar, durch stabile Integration von GFP-Reporterkonstrukten transgene Mäuse zu generieren, die es erlauben, die relativen Beiträge von pFLIP(1) und pFLIP(2) zur Expression von c-FLIP in Thymocyten unterschiedlicher Entwicklungs- und Reifestadien zu beurteilen.

3.iv. c-FLIP in Autoimmunerkrankungen

In Autoimmunerkrankungen beobachtet man eine verringerte Sensitivität von T-Lymphocyten gegen AICD und todesrezeptorvermittelte Apoptose, die mit erhöhter Expression von c-FLIP korreliert (Datta *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2001). Umgekehrt kann durch Überexpression von c-FLIP die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigt werden (Van Parijs *et al.*, 1999b). In experimentell induzierter Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE), einem murinen Modell für Multiple Sklerose, verursacht die Überexpression von c-FLIP in hämatopoetischen Zellen eine schwerere Ausprägung des Phänotyps (Djerbi *et al.*, 2003).

Eine detaillierte Analyse der Beiträge beider Promotoren zur Höherexpression von c-FLIP in den aktivierten T-Lymphocyten, die bei Autoimmunerkrankungen auftreten, wird dazu beitragen, die molekularen Hintergründe der beobachteten Apoptoseresistenz aufzuklären. Die Möglichkeit einer molekularen Intervention (s. u.) wäre gegeben, wenn auch hier Basalexpression und aktivierungsinduzierte Höherexpression von unterschiedlichen Promotoren abhängen würde.

3.v. c-FLIP als Tumorprogressionsfaktor

Resistenz gegen Todesrezeptor-induzierte Apoptose ist ein Phänomen, das in vielen Tumoren auftritt (Hanahan und Weinberg, 2000; Igney und Krammer, 2002). So wurde in Prostatakarzinom-Zelllinien eine androgenabhängige Expression von c-FLIP beobachtet, die zu beschleunigter Tumorprogression in einem murinen Transplantationsmodell führte (Gao *et al.*, 2005). In vielen Tumormodellen kann die Proliferation und Progression *in vivo* durch Überexpression von c-FLIP beschleunigt werden (Mathas *et al.*, 2004; Thome und Tschopp, 2001). In unterschiedlichen Tumorsystemen wurde festgestellt, dass die Expression von c-FLIP

transplantierte Tumorzelllinien vor T-Zell-vermittelter Cytotoxizität schützen kann (Medema *et al.*, 1999).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Expression von c-FLIP in Tumoren und Tumormodellen eine große Bedeutung für Immunevasion und Progression haben kann. Auch hier wäre es von großem Interesse, die Beteiligung beider Promotoren an der oft beobachteten Höherexpression zu analysieren.

3.vi. Manipulation der c-FLIP-Expression

In allen Systemen, in denen die Höherexpression von c-FLIP – ähnlich wie in den hier beschriebenen Experimenten – selektiv durch einen der beiden Promotoren bewirkt wird, eröffnen die unterschiedlichen 5'-UTRs Möglichkeiten zur molekularen Manipulation. Die Unterschiede zwischen den codierenden Bereichen von c-FLIP_L und c-FLIP_S sind ausreichend, um Isoform-selektiv wirksame siRNA-Oligonukleotide zu entwickeln (Sharp *et al.*, 2005). In ähnlicher Weise sollte es möglich sein, durch antisense- oder siRNA-Oligonukleotide selektiv die Expression von c-FLIP-mRNAs anhand ihrer 5'-UTR zu supprimieren. Diese Experimente sollten es erlauben, den relativen Beitrag beider Promotoren zur c-FLIP-vermittelten Resistenz gegen Todesrezeptor-abhängige Apoptose experimentell zu ermitteln.

Mit dieser Arbeit wurde demonstriert, dass die Expression von c-FLIP von zwei Promotoren abhängt, deren Regulation sich in T-Lymphocyten diametral voneinander unterscheidet. Es erscheint angebracht, vor diesem Hintergrund bereits bekannte Systeme erneut zu analysieren, in denen durch Expression von c-FLIP die Apoptosesensitivität zellulärer Systeme moduliert wird. Die Existenz einer aktivierungs-spezifischen 5'-UTR in *de novo* exprimierten c-FLIP-mRNAs kann es ermöglichen, selektiv diese stimulationsabhängig exprimierten RNAs zu manipulieren, um die Apoptosesensitivität aktivierter T-Lymphocyten zu reduzieren.

Literaturverzeichnis

- Abraham, R.T. und Weiss, A. (2004) Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol*, **4**, 301-308.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X. und Akey, C.W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, **9**, 423-432.
- Aravind, L., Dixit, V.M. und Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci*, **24**, 47-53.
- Arreaza, G., Salojin, K., Yang, W., Zhang, J., Gill, B., Mi, Q.S., Gao, J.X., Meagher, C., Cameron, M. und Delovitch, T.L. (2003) Deficient activation and resistance to activation-induced apoptosis of CD8⁺ T cells is associated with defective peripheral tolerance in nonobese diabetic mice. *Clin Immunol*, **107**, 103-115.
- Audic, Y. und Hartley, R.S. (2004) Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell*, **96**, 479-498.
- Ayoubi, T.A. und Van De Ven, W.J. (1996) Regulation of gene expression by alternative promoters. *Faseb J*, **10**, 453-460.
- Barclay, A.E., Franklin, K.J. und Prichard, M.L. (1944) *The fetal circulation and cardiovascular system and the changes they undergo at birth*. Blackwell, Oxford.
- Bentele, M., Lavrik, I., Ulrich, M., Stosser, S., Heermann, D.W., Kalthoff, H., Krammer, P.H. und Eils, R. (2004) Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis. *J Cell Biol*, **166**, 839-851.
- Bernardi, P., Broekemeier, K.M. und Pfeiffer, D.R. (1994) Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J.Bioenerg.Biomembr.*, **26**, 509-517.
- Boatright, K.M., Deis, C., Denault, J.B., Sutherlin, D.P. und Salvesen, G.S. (2004) Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *Biochem J*, **382**, 651-657.
- Bodmer, J.L., Schneider, P. und Tschopp, J. (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*, **27**, 19-26.
- Bosque, A., Pardo, J., Martinez-Lorenzo, M.J., Iturralde, M., Marzo, I., Pineiro, A., Alava, M.A., Naval, J. und Anel, A. (2005) Down-regulation of normal human T cell blast activation: roles of APO2L/TRAIL, FasL, and c-FLIP, Bim, or Bcl-x isoform expression. *J Leukoc Biol*, **77**, 568-578.
- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L. und Lenardo, M.J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, **288**, 2351-2354.

- Chao, D.T. und Korsmeyer, S.J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Reviews in Immunology*, **16**, 395-419.
- Chaudhary, P.M., Eby, M.T., Jasmin, A., Kumar, A., Liu, L. und Hood, L. (2000) Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene*, **19**, 4451-4460.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. und Dixit, V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, **81**, 505-512.
- Chiu, I.M., Touhalisky, K. und Baran, C. (2001) Multiple controlling mechanisms of FGF1 gene expression through multiple tissue-specific promoters. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **70**, 155-174.
- Clarke, P.G.H. und Clarke, S. (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat.Embryol.*, **193**, 81.
- Clements, J.L., Boerth, N.J., Lee, J.R. und Koretzky, G.A. (1999) Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu Rev Immunol*, **17**, 89-108.
- Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, **326 (Pt 1)**, 1-16.
- Datta, S.K., Zhang, L. und Xu, L. (2005) T-helper cell intrinsic defects in lupus that break peripheral tolerance to nuclear autoantigens. *J Mol Med*, **83**, 267-278.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. und Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-241.
- Davey, G.M., Kurts, C., Miller, J.F., Bouillet, P., Strasser, A., Brooks, A.G., Carbone, F.R. und Heath, W.R. (2002) Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med*, **196**, 947-955.
- Deane, J.A. und Fruman, D.A. (2004) Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol*, **22**, 563-598.
- Djerbi, M., Abdul-Majid, K.B., Abedi-Valugerdi, M., Olsson, T., Harris, R.A. und Grandien, A. (2003) Expression of the long form of human FLIP by retroviral gene transfer of hemopoietic stem cells exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, **170**, 2064-2073.
- Djerbi, M., Darreh-Shori, T., Zhivotovsky, B. und Grandien, A. (2001) Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different flip isoforms. *Scand J Immunol*, **54**, 180-189.
- Dohrman, A., Russell, J.Q., Cuenin, S., Fortner, K., Tschopp, J. und Budd, R.C. (2005) Cellular FLIP long form augments caspase activity and death of T cells through heterodimerization with and activation of caspase-8. *J Immunol*, **175**, 311-318.
- Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C. und Healy, J.I. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*, **386**, 855-858.

- Dougherty, D.C. und Sanders, M.M. (2005) Comparison of the responsiveness of the pGL3 and pGL4 luciferase reporter vectors to steroid hormones. *Biotechniques*, **39**, 203-207.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. und Henson, P.M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, **148**, 2207-2216.
- Ferri, K.F. und Kroemer, G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*, **3**, E255-263.
- Fischer, K.D., Kong, Y.Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L.E., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., Nghiem, M.P., Bouchard, D., Barbacid, M., Bernstein, A. und Penninger, J.M. (1998) Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol*, **8**, 554-562.
- Fulda, S., Meyer, E. und Debatin, K.M. (2000) Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. *Cancer Res*, **60**, 3947-3956.
- Ganten, T.M., Koschny, R., Haas, T.L., Sykora, J., Li-Weber, M., Herzer, K. und Walczak, H. (2005) Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells, but not human hepatocytes, to TRAIL. *Hepatology*, **42**, 588-597.
- Gao, S., Lee, P., Wang, H., Gerald, W., Adler, M., Zhang, L., Wang, Y.F. und Wang, Z. (2005) The androgen receptor directly targets the cellular Fas/FasL-associated death domain protein-like inhibitory protein gene to promote the androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Mol Endocrinol*, **19**, 1792-1802.
- Glucksmann, A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews*, **26**, 59-81.
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H. und Lavrik, I.N. (2005) c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **280**, 14507-14513.
- Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Arnold, E., Varfolomeev, E.E., Brodianskii, V.M. und Wallach, D. (1997) CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem*, **272**, 19641-19644.
- Gruss, H.J. und Dower, S.K. (1995) The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines Mol Ther*, **1**, 75-105.
- Han, D.K., Chaudhary, P.M., Wright, M.E., Friedman, C., Trask, B.J., Riedel, R.T., Baskin, D.G., Schwartz, S.M. und Hood, L. (1997) MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11333-11338.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Heath, W.R. und Carbone, F.R. (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, **19**, 47-64.
- Hennino, A., Berard, M., Casamayor-Palleja, M., Krammer, P.H. und Defrance, T. (2000) Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. *J Immunol*, **165**, 3023-3030.

- Hennino, A., Berard, M., Krammer, P.H. und DeFrance, T. (2001) FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med*, **193**, 447-458.
- Hildeman, D.A., Zhu, Y., Mitchell, T.C., Bouillet, P., Strasser, A., Kappler, J. und Marrack, P. (2002) Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity*, **16**, 759-767.
- Howard, L.M., Kohm, A.P., Castaneda, C.L. und Miller, S.D. (2005) Therapeutic blockade of TCR signal transduction and co-stimulation in autoimmune disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **4**, 205-216.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. und Dixit, V.M. (1997) I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD- 95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 17255-17257.
- Hu, W.H., Johnson, H. und Shu, H.B. (2000) Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *J Biol Chem*, **275**, 10838-10844.
- Igney, F.H. und Krammer, P.H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, **2**, 277-288.
- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. und Nunez, G. (1997) CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **94**, 10717-10722.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. und Tschopp, J. (1997a) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. **388**, 190-195.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. und Tschopp, J. (1997b) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, **388**, 190-195.
- Isakov, N. und Altman, A. (2002) Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol*, **20**, 761-794.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. und Nagata, S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, **66**, 233-243.
- Kataoka, T., Budd, R.C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsovics, M. und Tschopp, J. (2000) The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol*, **10**, 640-648.
- Kataoka, T., Ito, M., Budd, R.C., Tschopp, J. und Nagai, K. (2002) Expression level of c-FLIP versus Fas determines susceptibility to Fas ligand-induced cell death in murine thymoma EL-4 cells. *Exp Cell Res*, **273**, 256-264.
- Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J. und Tschopp, J. (1998) FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol*, **161**, 3936-3942.

- Kataoka, T. und Tschopp, J. (2004) N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol*, **24**, 2627-2636.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. und Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, **26**, 239-257.
- Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y., Green, R.D. und Ren, B. (2005) A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature*, **436**, 876-880.
- Kirchhoff, S., Muller, W.W., Krueger, A., Schmitz, I. und Krammer, P.H. (2000a) TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol*, **165**, 6293-6300.
- Kirchhoff, S., Muller, W.W., Li-Weber, M. und Krammer, P.H. (2000b) Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol*, **30**, 2765-2774.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. und Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, **14**, 5579-5588.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D. und Ashkenazi, A. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*, **276**, 2119-2124.
- Klas, C., Debatin, K.M., Jonker, R.R. und Krammer, P.H. (1993) Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol*, **5**, 625-630.
- Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407**, 789-795.
- Krammer, P.H., Dhein, J., Walczak, H., Behrmann, I., Mariani, S., Matiba, B., Fath, M., Daniel, P.T., Knipping, E., Westendorp, M.O. und et al. (1994) The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system. *Immunol Rev*, **142**, 175-191.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. und Wajant, H. (2001) NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *EMBO J*, **20**, 3964-3973.
- Kroemer, G. und Reed, J.C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, **6**, 513-519.
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2001) FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*, **21**, 8247-8254.
- Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E.L. und Schlossman, S.F. (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science*, **206**, 347-349.
- Lacronique, V., Mignon, A., Fabre, M., Viollet, B., Rouquet, N., Molina, T., Porteu, A., Henrion, A., Bouscary, D., Varlet, P., Joulin, V. und Kahn, A. (1996) Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nature Medicine*, **2**, 80-86.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lens, S.M., Kataoka, T., Fortner, K.A., Tinel, A., Ferrero, I., MacDonald, R.H., Hahne, M., Beermann, F., Attinger, A., Orbea, H.A., Budd, R.C. und Tschopp, J. (2002) The caspase 8 inhibitor c-FLIP(L) modulates T-cell receptor-induced proliferation but not activation-induced cell death of lymphocytes. *Mol Cell Biol*, **22**, 5419-5433.
- Leverkus, M., Walczak, H., McLellan, A., Fries, H.W., Terbeck, G., Brocker, E.B. und Kampgen, E. (2000) Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. *Blood*, **96**, 2628-2631.
- Lewis, R.S. (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, **19**, 497-521.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman, D.M., Simon, M.C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R. und Thompson, C.B. (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*, **6**, 1389-1399.
- Locksley, R.M., Killeen, N. und Lenardo, M.J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, **104**, 487-501.
- Loeffler, M. und Kroemer, G. (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*, **256**, 19-26.
- Los, M., Wesselborg, S. und Schulze-Osthoff, K. (1999) The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*, **10**, 629-639.
- Madge, L.A., Li, J.H., Choi, J. und Pober, J.S. (2003) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes vascular endothelial cells to cytokine-initiated cathepsin-dependent apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 21295-21306.
- Mathas, S., Lietz, A., Anagnostopoulos, I., Hummel, F., Wiesner, B., Janz, M., Jundt, F., Hirsch, B., Johrens-Leder, K., Vornlocher, H.P., Bommert, K., Stein, H. und Dorken, B. (2004) c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med*, **199**, 1041-1052.
- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P. und Korsmeyer, S.J. (1989) bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, **57**, 79-88.
- Medema, J.P., de Jong, J., van Hall, T., Melief, C.J. und Offringa, R. (1999) Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med*, **190**, 1033-1038.
- Mentz, F., Baudet, S., Blanc, C., Issaly, F., Binet, J.L. und Merle-Beral, H. (1998) Simple, fast method of detection apoptosis in lymphoid cells. *Cytometry*, **32**, 95-101.

- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. und Tschopp, J. (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. **21**, 5299-5305.
- Moriishi, K., Huang, D.C., Cory, S. und Adams, J.M. (1999) Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**, 9683-9688.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. und Dixit, V.M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, **85**, 817-827.
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, **256**, 12-18.
- Nakano, K. und Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, **7**, 683-694.
- Newmeyer, D.D., Bossy-Wetzel, E., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Beere, H.M. und Green, D.R. (2000) Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ*, **7**, 402-407.
- Norbury, C.J. und Zivnotovsky, B. (2004) DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, **23**, 2797-2808.
- Obrig, T.G., Culp, W.J., McKeehan, W.L. und Hardesty, B. (1971) The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem*, **246**, 174-181.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. und Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053-1058.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J. und Trauth, B.C. (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 10709-10715.
- Ollila, J. und Vihinen, M. (2005) B cells. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 518-523.
- Panka, D.J., Mano, T., Suhara, T., Walsh, K. und Mier, J.W. (2001a) Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Activity Regulates c-FLIP Expression in Tumor Cells. *J Biol Chem*, **276**, 6893-6896.
- Panka, D.J., Mano, T., Suhara, T., Walsh, K. und Mier, J.W. (2001b) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J Biol Chem*, **276**, 6893-6896.
- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M.G., Di Leve, G., Signore, A. und Ruberti, G. (1999) Identification and Characterization of a Ligand-independent Oligomerization Domain in the Extracellular Region of the CD95 Death Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 38241-38250.

- Perlman, H., Pagliari, L.J., Georganas, C., Mano, T., Walsh, K. und Pope, R.M. (1999) FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated apoptosis. *J Exp Med*, **190**, 1679-1688.
- Petit, P.X., Lecoecur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B. und Gougeon, M.L. (1995) Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, **130**, 157-167.
- Pitcher, L.A. und van Oers, N.S. (2003) T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol*, **24**, 554-560.
- Proksch, P., Giaisi, M., Treiber, M.K., Palfi, K., Merling, A., Spring, H., Krammer, P.H. und Li-Weber, M. (2005) Rocaglamide derivatives are immunosuppressive phytochemicals that target NF-AT activity in T cells. *J Immunol*, **174**, 7075-7084.
- Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hadano, S., Houtzager, V.M., Seiden, I., Keen, S.L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B.F., Peterson, E.P., Thornberry, N.A., Huang, J., MacPherson, D.P., Black, S.C., Hornung, F., Lenardo, M.J., Hayden, M.R., Roy, S. und Nicholson, D.W. (1998) Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ*, **5**, 271-288.
- Razzaq, T.M., Ozegbe, P., Jury, E.C., Sembi, P., Blackwell, N.M. und Kabouridis, P.S. (2004) Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology*, **113**, 413-426.
- Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C.A., Tschopp, J. und Abbas, A.K. (1998) Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*, **8**, 615-623.
- Roberts, A.G., Redding, S.J. und Llewellyn, D.H. (2005) An alternatively-spliced exon in the 5'-UTR of human ALAS1 mRNA inhibits translation and renders it resistant to haem-mediated decay. *FEBS Lett*, **579**, 1061-1066.
- Rodriguez, I., Matsuura, K., Khatib, K., Reed, J.C., Nagata, S. und Vassalli, P. (1996) A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. *The Journal of Experimental Medicine*, **183**, 1031-1036.
- Roths, J.B., Murphy, E.D. und Eicher, E.M. (1984) A new mutation, gld, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med*, **159**, 1-20.
- Ruland, J. und Mak, T.W. (2003) From antigen to activation: specific signal transduction pathways linking antigen receptors to NF-kappaB. *Semin Immunol*, **15**, 177-183.
- Sakaguchi, S. (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, **6**, 345-352.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, NY.
- Savill, J.S., Fadok, V., Henson, P. und Haslett, J.E. (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis *Immunology Today*, **14**, 131.

- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. und Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, **17**, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H. und Peter, M.E. (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 1541-1548.
- Scheid, M.P. und Duronio, V. (1998) Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**, 7439-7444.
- Scheid, M.P., Schubert, K.M. und Duronio, V. (1999) Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 31108-31113.
- Schmitz, I., Krueger, A., Baumann, S., Schulze-Bergkamen, H., Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2003) An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol*, **171**, 2930-2936.
- Schmitz, I., Weyd, H., Krueger, A., Baumann, S., Fas, S.C., Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2004) Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *J Immunol*, **172**, 2194-2200.
- Schneider, U., Schwenk, H.U. und Bornkamm, G. (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, **19**, 621-626.
- Sharp, D.A., Lawrence, D.A. und Ashkenazi, A. (2005) Selective knockdown of the long variant of cellular FLICE inhibitory protein augments death receptor-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem*, **280**, 19401-19409.
- Shu, H.B., Halpin, D.R. und Goeddel, D.V. (1997a) Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*, **6**, 751-763.
- Shu, H.-B., Halpin, D.R. und Goeddel, D.V. (1997b) Casper Is a FADD- and Caspase-Related Inducer of Apoptosis. *Immunity*, **6**, 751-763.
- Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y. und Lenardo, M.J. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, **288**, 2354-2357.
- Siegel, R.M., Martin, D.A., Zheng, L., Ng, S.Y., Bertin, J., Cohen, J. und Lenardo, M.J. (1998) Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol*, **141**, 1243-1253.
- Spector, M.S., Desnoyers, S., Hoepfner, D.J. und Hengartner, M.O. (1997) Interaction between the C. elegans cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature*, **385**, 653-656.
- Sprick, M., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. und Walczak, H. (2002) Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J*, **21**, 4520-4530.

- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C.M., Litwack, G., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C. und Alnemri, E.S. (1997) FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 18542-18545.
- Starck, L., Scholz, C., Dorken, B. und Daniel, P.T. (2005) Costimulation by CD137/4-1BB inhibits T cell apoptosis and induces Bcl-xL and c-FLIP(short) via phosphatidylinositol 3-kinase and AKT/protein kinase B. *Eur J Immunol*, **35**, 1257-1266.
- Stennicke, H.R. und Salvesen, G.S. (1998) Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta*, **1387**, 17-31.
- Strasser, A. (1995) Life and death during lymphocyte development and function: evidence for two distinct killing mechanisms. *Curr Opin Immunol*, **7**, 228-234.
- Strasser, A., Harris, A.W. und Cory, S. (1991) bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell*, **67**, 889-899.
- Strasser, A., O'Connor, L. und Dixit, V.M. (2000a) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, **69**, 217-245.
- Strasser, A., Puthalakath, H., Bouillet, P., Huang, D.C., O'Connor, L., O'Reilly, L.A., Cullen, L., Cory, S. und Adams, J.M. (2000b) The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci*, **917**, 541-548.
- Suhara, T., Mano, T., Oliveira, B.E. und Walsh, K. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Circ Res*, **89**, 13-19.
- Takahama, Y. und Nakauchi, H. (1996) Phorbol ester and calcium ionophore can replace TCR signals that induce positive selection of CD4 T cells. *J Immunol*, **157**, 1508-1513.
- Takahashi, A., Masuda, A., Sun, M., Centonze, V.E. und Herman, B. (2004) Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). *Brain Res Bull*, **62**, 497-504.
- Thome, M. und Tschopp, J. (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol*, **1**, 50-58.
- Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.
- Thornberry, N.A. und Lazebnik, Y. (1998) Caspases: Enemies Within. *Science*, **281**, 1312-1316.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M. und Krammer, P.H. (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, **245**, 301-305.
- Uriarte, S.M., Joshi-Barve, S., Song, Z., Sahoo, R., Gobejishvili, L., Jala, V.R., Haribabu, B., McClain, C. und Barve, S. (2005) Akt inhibition upregulates FasL, downregulates c-FLIPs and induces caspase-8-dependent cell death in Jurkat T lymphocytes. *Cell Death Differ*, **12**, 233-242.

- Van den Eertwegh, A.J., Boersma, W.J. und Claassen, E. (1992) Immunological functions and in vivo cell-cell interactions of T cells in the spleen. *Crit Rev Immunol*, **11**, 337-380.
- van Oers, N.S. und Weiss, A. (1995) The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Semin Immunol*, **7**, 227-236.
- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Abbas, A.K. und Baltimore, D. (1999a) Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C-FLIP in lymphocytes. *Immunity*, **11**, 763-770.
- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Abbas, A.K. und Baltimore, D. (1999b) Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C-FLIP in lymphocytes. *Immunity*, **11**, 763-770.
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. und Wallach, D. (1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, **9**, 267-276.
- Vaux, D.L. und Korsmeyer, S.J. (1999) Cell death in development. *Cell*, **96**, 245-254.
- Vieira, H.L., Haouzi, D., El Hamel, C., Jacotot, E., Belzacq, A.S., Brenner, C. und Kroemer, G. (2000) Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ*, **7**, 1146-1154.
- Wadkins, R.M., Jares-Erijman, E.A., Klement, R., Rudiger, A. und Jovin, T.M. (1996) Actinomycin D binding to single-stranded DNA: sequence specificity and hemi-intercalation model from fluorescence and ¹H NMR spectroscopy. *J Mol Biol*, **262**, 53-68.
- Wang, J., Lobito, A.A., Shen, F., Hornung, F., Winoto, A. und Lenardo, M.J. (2000) Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. *Eur J Immunol*, **30**, 155-163.
- Wang, W., Prince, C., Mou, Y. und Pollman, M.J. (2002) Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation: Resistance to FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **29**, 29.
- Wang, Y., Newton, D.C. und Marsden, P.A. (1999) Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev Neurobiol*, **13**, 21-43.
- Weber, C.H. und Vincenz, C. (2001) The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci*, **26**, 475-481.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. und Korsmeyer, S.J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **292**, 727-730.
- Weil, R. und Israel, A. (2004) T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, **16**, 374-381.
- Werlen, G., Jacinto, E., Xia, Y. und Karin, M. (1998) Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *Embo J*, **17**, 3101-3111.

- Wilde, J.I. und Watson, S.P. (2001) Regulation of phospholipase C gamma isoforms in haematopoietic cells: why one, not the other? *Cell Signal*, **13**, 691-701.
- Wingender, E., Chen, X., Fricke, E., Geffers, R., Hehl, R., Liebich, I., Krull, M., Matys, V., Michael, H., Ohnhauser, R., Pruss, M., Schacherer, F., Thiele, S. und Urbach, S. (2001) The TRANSFAC system on gene expression regulation. **29**, 281-283.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-556.
- Yeh, W.C., Irie, A., Elia, A.J., Ng, M., Shu, H.B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D.V. und Mak, T.W. (2000) Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*, **12**, 633-642.
- Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V. und Mak, T.W. (1998) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, **279**, 1954-1958.
- Yonehara, S., Ishii, A. und Yonehara, M. (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *The Journal of Experimental Medicine*, **169**, 1747-1756.
- Zamzami, N., El Hamel, C., Maise, C., Brenner, C., Munoz-Pinedo, C., Belzacq, A.S., Costantini, P., Vieira, H., Loeffler, M., Molle, G. und Kroemer, G. (2000) Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene*, **19**, 6342-6350.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X. und Kroemer, G. (1995) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, **181**, 1661-1672.
- Zha, J., Harada, H., Osipov, K., Jockel, J., Waksman, G. und Korsmeyer, S.J. (1997) BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem*, **272**, 24101-24104.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. und Korsmeyer, S.J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, **87**, 619-628.
- Zhang, J., Bardos, T., Mikecz, K., Finnegan, A. und Glant, T.T. (2001) Impaired Fas signaling pathway is involved in defective T cell apoptosis in autoimmune murine arthritis. *J Immunol*, **166**, 4981-4986.
- Zhang, N. und He, Y.W. (2005a) The antiapoptotic protein Bcl-xL is dispensable for the development of effector and memory T lymphocytes. *J Immunol*, **174**, 6967-6973.
- Zhang, N. und He, Y.W. (2005b) An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. *J Exp Med*, **202**, 395-404.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. und Wang, X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, **274**, 11549-11556.

Zuniga-Pflucker, J.C. (2004) T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol*, **4**, 67-72.